

PHD ÉRTEKEZÉS

A KALMODULIN GÉNEXPRESSZIÓ FUNKCIONÁLIS
VIZSGÁLATA ÉS A H_{MAX} ÉRTÉK SZÁMÍTÁSA
PATKÁNYAGYI RÉGIÓKBAN

VÍZI SÁNDOR

TÉMAVEZETŐ: DR. GULYA KÁROLY
TANSZÉKVEZETŐ EGYETEMI TANÁR

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR, ÁLLATTANI ÉS SEJTBiolóGIAI TANSZÉK

SZEGED
2000

TARTALOM

A RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA	3
BEVEZETÉS	6
<i>A CaM génexpresszió</i>	7
<i>A krónikus etanolkezelés és -megvonás</i>	12
<i>A Hmax érték számítása</i>	13
CÉLKITŰZÉSEK	16
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
<i>Kísérleti állatok és szövetpreparálás</i>	17
<i>cRNS próbák</i>	18
<i>Standard skálák</i>	21
<i>In situ hibridizáció</i>	22
<i>Autoradiográfia, képanalízis, és mikroszkópia</i>	23
<i>Adatfeldolgozás</i>	25
EREDMÉNYEK	27
<i>A cRNS próbákkal végzett kontroll hibridizációk</i>	27
<i>A krónikus etanolkezelés és -megvonás hatása a CaM génexpresszióra patkányagyban</i>	27
<i>Az agypaszta és a membrán standard skálák közti viszony lineáris</i>	31
<i>Az agyterületek telítődése; a Hmax érték</i>	33
<i>A telítési adatok átalakítása</i>	36
<i>A Hmax értékek számítása nem-telítési cRNS próbakonzentrációnál végzett hibridizációk adataiból</i>	39
<i>A Hmax értékek számítására szolgáló módszer összefoglalása</i>	41
MEGBESZÉLÉS	44
<i>Regionális analízis: az etanolkezelésre és -megvonásra reagáló agyterületek</i>	44
<i>Funkcionális analízis: a CaM génexpresszió szabályozása</i>	45
<i>A relatív kvantitálás és a Hmax érték számítására szolgáló módszer</i>	48
<i>Az abszolút kvantitálás: a cRNS próba kópiaszám érték és az mRNS mennyiség viszonya</i>	50
<i>Összefoglalás</i>	52
FELHASZNÁLT IRODALOM	54
A PhD ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÁSA	60
SUMMARY OF PhD THESIS	63
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	66

A RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA

Az agyterületek elnevezése (Paxinos és Watson, 1986) alapján, az agyterületek nevének rövidítése (Palkovits, 1980) alapján történt.

Arc	nucleus arcuatus
AT	nucleus anterior ventralis et medialis thalami
ATP	adenozin 5'-trifoszfát
BA	nucleus amygdaloideus basalis
bp	bázispár
CA1-3	a hippocampus CA1-3 piramissejtjeinek rétege, az Ammon-szarv (cornu Ammonis) része
Ca ²⁺	kalciumion
[Ca ²⁺] _i	intracelluláris szabad kalciumion-koncentráció
CaM	kalmodulin
CaMI-III	I-III kalmodulin gének
cAMP	adenozin 3', 5'-ciklikus monofoszfát
Cg	cortex cingularis
CIP	marha intesztinális foszfataz
cpm	a detektált másodpercenkénti radioaktív bomlások száma (counts per minute)
CPu	caudatus putamen
CRE	cAMP-érzékeny szekvenciaelem (cAMP responsive element)
cRNS	komplementer ribonukleinsav
dG	szabadentalpia-változás
DG	a gyrus dentatus granularis sejtjeinek rétege
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezinukleotid 5'-trifoszfát
dpi	a hüvelykenkénti pontok száma (dots per inch)
dpm	a másodpercenkénti radioaktív bomlások száma (disintegrations per minute)
DTT	ditiotreitol
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
fi	fimbria hippocampi
GABA	γ-amino-n-butánsav
GP	globus pallidus

Hmax	a [³⁵ S]-cRNS próbának azon maximális moláris mennyisége (ISH kópiaszámban kifejezve), amely a régió egységnyi (1 mm ² -nyi) területén az alkalmazott kísérleti körülmények között hibridizál
HMol	a hippocampus CA1 és CA2 molecularis rétegei
IEG	azonnali korai gének (immediate early genes)
ISH	<i>in situ</i> hibridizáció
K ⁺	káliumion
Kd	disszociációs állandó
kDa	10 ³ Dalton
LHb	nucleus habenulae laterális
LMP	alacsony olvadáspontú (low melting point)
LSC	folyadékszintillációs számlálás (liquid scintillation counting)
MgCl ₂	magnézium-klorid
MHb	nucleus habenulae medialis
mp	másodperc
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
mtsai.	munkatársai
Na ⁺	nátriumion
NaCl	nátrium-klorid
NaOAc	nátrium-acetát
NMDA	n-metil-D-aszparaginsav
Oc	cortex occipitalis
Par	cortex parietalis
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
Pir	cortex piriformis
RNáz A	ribonukleáz A
rpm	percenkénti fordulatszám (revolutions per minute)
SCh	nucleus suprachiasmaticus
SDS	nátrim-laurilszulfát (sodium dodecyl sulfate)
SE	standard hiba (standard error)
SEM	az átlag standard hibája (standard error of the mean)
TAE	Tris-acetát-EDTA
Te	cortex temporalis
TE	Tris-EDTA
Tm	olvadáspont (melting point)
Tris	tris-hidroximetil-aminometán
tRNS	transzfer RNS

% v/v térfogatszázalék

VMH nucleus ventromedialis hypothalami

VPL+VPM nucleus ventralis thalami

% w/v vegyesszázalék

[³⁵S]-UTP α S az α -helyzetű foszforon 35-ös tömegszámú kénnel szubsztituált uridin
5'-trifoszfát

BEVEZETÉS

Az élő anyag alapvető jellemzője a szervezethez, amelynek kialakítása és fenntartása szükségessé teszi a kommunikációt az élővilág különböző szerveződési szintjein belül és azok között. A molekuláris kölcsönhatásokra épülő sejt szintű kommunikáció hasonló mechanizmusokat használ az egész élővilágban. Az egyik ilyen általános, minden eukarióta élőlényre jellemző sejt szintű kommunikációs forma a kalciumionok (Ca^{2+}) segítségével történő jelátvitel. A Ca^{2+} -jelátvitel esetében a információt az intracelluláris szabad Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) tér és -időbeli változásai kódolják (Berridge, 1998). Ezen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -változások kialakításában alapvető szerepet játszanak azok az ionpumpák, ioncserélők és ioncsatornák, amelyek a transzmembrán Ca^{2+} -grádiensek létrehozásáért, fenntartásáért és megváltoztatásáért felelősek. A transzmembrán Ca^{2+} -grádiensek változásai által kialakított Ca^{2+} -jelek lokális módosításában, és azoknak a fehérjeszintű kölcsönhatások szintjére történő átvitelében (mediálásában) az ún. Ca^{2+} -kötő fehérjék játszik az elsődleges szerepet. A Ca^{2+} -kötő fehérjék közé számos fehérjecsalád tartozik (Baimbridge és mtsai., 1992), amelyek közül a legismertebb az "EF-hand" típusú Ca^{2+} -kötő fehérjéké. Ez a fehérjecsalád több mint 150 tagot számlál, amelyek előfordulnak gerincesekben és gerinctelenekben egyaránt (Andressen és mtsai., 1993). A fehérjecsalád nevében szereplő "EF-hand" kifejezés az ide tartozó fehérjék közös szerkezeti jellemzőjére, egy hélix-hurok-hélix szerkezetű Ca^{2+} -kötő fehérjedoménre utal, amely az "EF-hand" típusú Ca^{2+} -kötő fehérjékben mint kizárólagos és ismétlődő szerkezeti elem van jelen, míg más fehérjékben egyéb szerkezeti elemekkel együtt fordul elő. A "EF-hand" típusú Ca^{2+} -kötő fehérjéket funkciójuk alapján hagyományosan két csoportra osztják: az ún. "trigger" fehérjékre (például kalmodulin, troponin-C), amelyek a Ca^{2+} -ok megkötése következtében előbb maguk is konformációváltozáson mennek át, hogy ezután más – gyakran enzimaktivitással rendelkező – fehérjékhez kötődve azok aktivitását módosítsák, és az ún. "puffer" fehérjékre (például parvalbumin, kalretinin, kalbindin-D28k), amelyeknek az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedésének mérséklésén kívül egyéb szerepe nincs, illetve nem ismert (Baimbridge és mtsai., 1992). A "trigger" fehérjék közé tartoznak az intracelluláris Ca^{2+} -jelek mediátorai is, amelyek közül az élővilágban a legáltalánosabban előforduló és a legtöbbet vizsgált a kalmodulin (CaM).

A CaM 148 aminosavból álló, 17 kDa molekulatömegű, savas jellegű, hőstabil fehérje, amely négy "EF-hand"-doménból épül fel. A CaM valamennyi eukarióta sejtben megtalálható és olyan alapvető folyamatok irányításában vesz részt, mint a sejtosztódás, a motilitás, a szekréció, továbbá az ioncsatornák és a génexpresszió szabályozása (Deisseroth és mtsai., 1998; Levitan, 1999; Means és mtsai., 1982; Means és mtsai., 1991). Különösen fontos feladatot lát el a CaM az ún. ingerlékeny sejt típusokban, amelyekben a Ca^{2+} -jelátvitel

kitüntetett szereppel bír mind a lokális, mind a sejtszintű aktivitás szabályozásában, és a két szabályozási szint összekapcsolásában (Deisseroth és mtsai., 1998; Levitan, 1999). A CaM-nak az idegsejtekben betöltött funkciója jelenleg is élénk kutatás tárgyát képezi: az ezirányú vizsgálatok a CaM-nak a Ca^{2+} -ok megkötése nyomán bekövetkező konformációváltozásának jellemzésétől (Yap és mtsai., 1999) a CaM-aktivitás szabályozásának feltárásán keresztül (Quadroni és mtsai., 1994) a CaM szubsztrátjainak azonosításáig terjednek (Rogers és Strehler, 1996).

A CaM-aktivitás szabályozása több szinten valósul meg: (a) a CaM hírvivő RNS-ek (mRNS-ek) szintézisének, érésének, lokalizációjának és lebontásának szintjén, (b) a CaM fehérje szintézisének, transzportjának és lebontásának szintjén, valamint (c) a CaM fehérje poszttranszlációs módosításának szintjén. A CaM-aktivitás szabályozásának valamennyi szintjére vonatkozóan rendelkezünk már adatokkal: ismertté vált(ak) a CaM fehérje foszforilációs szabályozásának egyes elemei (Joyal és mtsai., 1996; Quadroni és mtsai., 1994), a CaM fehérje intracelluláris (nukleáris) transzportjának jelentősége (Deisseroth és mtsai., 1998), továbbá a CaM génexpresszió és mRNS lokalizáció szabályozásának több részlete is (Berry és Brown, 1996; Toutenhoofd és mtsai., 1998; Zhang és mtsai., 1993). A CaM génexpresszió szabályozását illetően azonban még nem alakult ki egységes és általánosan elfogadott elmélet, főként azért, mert még nem áll rendelkezésre elegendő, a génexpressziós változásokban tapasztalható szabályszerűségeket feltáró kísérleti eredmény. Vizsgálatainkkal egy ilyen egységes, a CaM génexpresszió szabályozását leíró elmélet létrejöttéhez kívántunk hozzájárulni.

A CaM génexpresszió

A Ca^{2+} -jelek fő mediátoraként ismert CaM fehérje és az azt kódoló gén(ek) minden eddig vizsgált eukarióta élőlényben megtalálhatók. A CaM gén(eke)t kimutatták már élesztőben, protozoában, zöldalgában, gombában, magasabbrendű növényekben, valamint gerinctelen és gerinces állatokban is (Koller és mtsai., 1990). Az eukarióta élőlényekben általában csak egyféle CaM fehérje fordul elő [kivéteklént említhető például az *Arbacia punctulata* tengeri sün és valószínűleg a *Naegleria ostoros* is, amelyekben kétféle CaM fehérje van jelen (Fulton és mtsai., 1986)]. Az általánosan jellemző egyedüli CaM fehérjével szemben a CaM gén(ek) száma és genomikus szerveződése jelentős eltéréseket mutat az eukarióták egyes csoportjainál. Így például az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*), a *Paramecium tetraurelia*, az *Aspergillus nidulans*, a *Dyctiostelium discoideum* és az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) genomjában is csak egy CaM gén található (Davis

és mtsai., 1986; Goldhagen és Clarke, 1986; Kink és mtsai., 1990; Lu és mtsai., 1992; Smith és mtsai., 1987), míg a *Trypanosoma brucei* három – tandem elrendeződésű és intron nélküli – CaM gént hordoz (Tschudi és Ullu, 1988).

A gerinceseknél a CaM vonatkozásában a “több gén – egy fehérje” elv érvényesül. Az eddig vizsgált gerinces fajok mindegyike csak egyetlen CaM fehérjét hordoz, amelynek aminosavsorrendje mindenhol azonos [kivétel az elektromos angolna (*Electrophorus electricus*), amelynél a konszenzus aminosav-szekvenciától egy aminosavnyi eltérés tapasztalható (Lagacé és mtsai., 1983)]. Ugyanakkor a gerincesek genomjában három [a medaka nevű csontos hal (*Oryzias latipes*) genomjában négy (Matsuo és mtsai., 1992)] működő CaM gént és több CaM pszeudogént azonosítottak (Nojima, 1989; Rhyner és mtsai., 1994). A CaM pszeudogének szekvenciaanalízis-adatai alapján mindegyik CaM pszeudogénről ismert, hogy mely működő CaM génből alakult ki. A CaM pszeudogének az eddigi vizsgálatok szerint nem expresszálódnak (Ikeshima és mtsai., 1993).

A gerincesek három működő CaM génje a Nojima és munkatársai által bevezetett nomenklaturában a CaM I, CaM II, és CaM III elnevezést kapta (Nojima és mtsai., 1987; Nojima, 1989). A három CaM gén kromoszómális lokalizációját emberben már meghatározták [CaM I: 14q24-q31, CaM II: 2p21.1-p21.3, és CaM III: 19q13.2-q13.3 (Berchtold és mtsai., 1993)]. Mára számos gerinces fajból ismertté váltak CaM génszekvenciák, és két gerinces fajban (patkányban és emberben) mindhárom gén szekvenciája ismert (Koller és mtsai., 1990; Nojima és Sokabe, 1987; Nojima, 1989; Rhyner és mtsai., 1994; Toutenhoofd és mtsai., 1998). A működő CaM gének szekvenciáinak elemzése valószínűsíti, hogy a CaM gének a gerinces evolúció folyamán külön fejlődési utat jártak be. Ezt a feltevést alátámasztja azon észlelés, amely szerint a gerinceseknél a különböző fajok azonos osztályú CaM génjei között a homológia jelentős mértékű, míg fajon belül a három CaM gén között csekély. A fenti különbség különösen kifejezett a 3'-nemkódoló szakaszok esetében: a patkány és a humán CaM gének ezen régióit tekintve a homológia mértéke a gén-osztályokon belül mintegy 90 %, míg a fajokon belül hozzávetőlegesen 35 % (Koller és mtsai., 1990). Fajokon belül a CaM gének kódoló szekvenciáinak divergenciája is viszonylag nagy: megközelíti azt a határértéket, amelynél különböző DNS-szakaszok még kódolhatják ugyanazt a fehérjét [például a humán CaM III gén kódoló szekvenciája csak 81,8, illetve 81,1 %-os homológiát mutat a humán CaM I, illetve CaM II gén kódoló szekvenciájával, míg a patkány CaM III gén kódoló szekvenciájával 92,1 %-os egyezést mutat (Fischer és mtsai., 1988)]. Egy adott faj CaM génjei nemkódoló szakaszainak abszolút értelemben, valamint kódoló szakaszainak relatív értelemben nagy divergenciája arra utal, hogy a CaM gének evolúciós léptékben mérve is hosszú ideig, jelentős szelekciós nyomás alatt fejlődve érték el mai állapotukat. Azt a tényt, hogy ilyen körülmények között is fennmaradt három, egyazon fehérjét kódoló – látszólag

redundáns – CaM gén, jól magyarázza az a feltevés, amely szerint az egyes CaM génekhez különböző, a másik két CaM gén által legfeljebb részben pótolható funkció rendelhető (Fischer és mtsai., 1988; Koller és Strehler, 1993). Ezt a hipotézist az alábbiak erősítik meg.

(a) A CaM mRNS-osztályok különböző intracelluláris lokalizációja

Az mRNS-ek célzott intracelluláris transzportjának jelentősége és részletei napjainkra már számos biológiai rendszerben ismertté váltak (Kiebler és DesGroseillers, 2000; Oleynikov és Singer, 1998). Az idegsejtekben – azok szélsőségesen anizometrikus alakja miatt – a célzott mRNS-transzport különös jelentőséggel bír. A neuronokban az mRNS-ek szubcelluláris doménekre specifikus lokalizációja az adott doménra jellemző sajátosságok kialakításának egyik fontos eszköze. Így például a dendritokba transzportált mRNS-eknek a neuronális aktivitástól függő transzlációja olyan elemi plaszticitási folyamatok részét képezi, amelyek magasabbrendű idegi tevékenységek (például tanulás) alapjául szolgálnak (Martin és mtsai., 1997; Morris, 1997).

A CaM mRNS-ek lehetséges célzott intracelluláris transzportjára vonatkozóan is végeztek vizsgálatokat. PC12 sejtvonalban végzett mérések szerint a CaM I, CaM II és CaM III géneknek megfelelő három CaM mRNS-osztály intracelluláris lokalizációja eltérő (Zhang és mtsai., 1993). A PC12 sejtekben a CaM I mRNS-ek dendritikus transzlokációja volt a legkifejezettebb; ezen CaM mRNS-osztály jellegzetes dendritikus lokalizációját patkányagynban is leírták (Berry és Brown, 1996). A CaM mRNS-osztályok különböző intracelluláris lokalizációja feltételezi, hogy a három CaM mRNS-osztály eltérő mértékben játszik szerepet a domén-specifikus transzlációs folyamatokban, ami a három CaM gén közötti funkcionális különbségre utal.

(b) A CaM mRNS-osztályok feltételezett cisz-szabályzó régióinak különbözősége

A három CaM gén fentebb említett homológiaviszonyai – a különböző gerinces fajok azonos osztályú CaM génjei közötti jelentős, illetve fajokon belül a három CaM gén közötti csekély hasonlóság – a feltételezett szabályzó szakaszokra is érvényesek. Így a humán és a patkány CaM I gén esetében a promóter régiók hasonlósága 65 % körüli, az 1. intronok homológiája pedig még jelentősebb, több mint 70 % (Rhyner és mtsai., 1994). A CaM II géneket összevetve hasonló viszonyokat találunk: az 5'-határoló szekvenciákat az 1. exonokkal együtt tekintve a humán és a patkány szekvenciák homológiája jelentős (82 %). Ez igaz az 1. intronok esetére is, amelyek 72 %-os a homológiát mutatnak az első 200 bp, és 86 %-ost az utolsó 100 bp területén. Ezzel szemben a 2., 3. és 4. intronok közötti hasonlóság csekély [rendre 45 %, 41 % és 48 % (Toutenhoofd és mtsai., 1998)]. A

szekvenciák homológiaviszonyai alapján feltehető, hogy a CaM I és CaM II gének esetében a szabályzó szakaszok közé sorolhatók az 5'-határoló szekvenciák mellett az 1. intronok is.

A három CaM gén feltételezett szabályzó régiói szekvenciáinak birtokában lehetővé vált ismert szekvenciaelemek azonosítása. Ezek előfordulása alapvetően eltérő volt a három humán CaM promóterben (Toutenhoofd és mtsai., 1998). Kanonikus TATA boxot csak a CaM I promóterben sikerült kimutatni. A CaM II promóter egy TATA-box-szerű szekvenciát tartalmaz (-27 pozícióban) és egy jó iniciátor szekvenciaelemet a második fő transzkripció starthely közelében (+7 körül). Az 5'-határoló szekvenciák GC-tartalmát tekintve a CaM I és CaM III promóter bizonyult erősen GC-gazdagnak. Az azonnali korai gének (IEG) konszenzus szekvenciáit (AP1 és AP2) csak a CaM II és a CaM III promóterekben sikerült azonosítani. Az általános szöveti transzkripció faktornak megfelelő SP1 konszenzus szekvencia csoportos előfordulása (SP1 csoportok) a CaM III – és kisebb mértékben a CaM I – promóterre jellemző. A cAMP-érzékeny szekvenciaelem (CRE) a CaM II és CaM III promóterben van jelen, a CAAT-szekvenciaelem viszont mindhárom humán promóterben előfordul. Szintén előfordul mindhárom CaM gén (és számos más Ca^{2+} -kötő fehérje) promóterében a (GCGG)AGGGA szekvencia, amely a neuronspecifikus expresszió biztosításában játszhat szerepet (Matsuo és mtsai., 1993). A gerinces fajok CaM promótereiben azonosított konzervatív szekvenciák közül a H1 és a H2 a CaM II (Matsuo és mtsai., 1993), míg a H3 a CaM II és a CaM III (Shimoda és mtsai., 1995) promóterében fordul elő. Ezen konzervatív szekvenciák funkcionális szerepe még nem egyértelműen tisztázott.

Szembevetve, hogy a CaM III gén szabályzó régiója több tekintetben a háztartási gének promótereinek jellemzőit mutatja. A CaM III promóter esetében ilyen jellemzők a magas GC-arány [77 % patkányban és 80 % emberben (Koller és Strehler, 1993)], a CpG dinukleotidok más háztartási promóterekhez viszonyítva is magas száma [emberben -300 és +100 között 68 darab fordul elő (Koller és Strehler, 1993; Shimoda és mtsai., 1995)], a klasszikus, -20 / -30 körüli TATA box, valamint a -80 körüli CAAT-box hiánya [emberben nincs TATA-box, és a legközelebbi CAAT-box is -180 körül van, patkányban pedig ez is hiányzik (Koller és mtsai., 1990; Koller és Strehler, 1993)], a több kis transzkripció iniciációs hely (Koller és mtsai., 1990), a sok SP1 kötőhely [emberben 9 darab fordul elő (Koller és mtsai., 1990)], és a közvetlen ismétlődések a promóterben [emberben 5 darab 17 bp-os "imperpekt" közvetlen ismétlődésből álló sorozat van -1 és -250 között (Koller és mtsai., 1990)].

Már született néhány olyan kísérleti eredmény, amely közvetve alátámasztja a fent említett szekvenciaelemeknek az adott CaM gén expressziójára gyakorolt tényleges befolyását. Így például azt tapasztalták, hogy a patkány CaM II promóterben a H2 szekvencia delécioja igen jelentős, kb. 75 %-os expressziócsökkenést okoz (Matsuo és

mtsai., 1993), a patkány CaM III promóterben pedig a -703-tól -524-ig terjedő, a H3 szekvenciát is tartalmazó szakasz [emberben ez átfed egy SP1-csoportot magába foglaló régióval (Koller és Strehler, 1993)] kiesése idéz elő mintegy 50 %-os expressziócsökkenést (Shimoda és mtsai., 1995). Közvetlen és részletes bizonyítékok azonban még nem állnak rendelkezésre a szabályzóelemek működésére vonatkozóan.

Összegezve megállapítható, hogy a vizsgált gerinceseknél az azonos osztályú CaM gének szabályzó régiói viszonylag konzerváltak, és a CaM III promóter háztartási jellege is állandónak mutatkozik. A fajok közti különbséget például az jelzi, hogy a humán és a patkány CaM I promóter közti homológia -200-tól 5' irányba haladva szignifikánsan csökken (Rhyner és mtsai., 1994). Egy adott fajon belül a CaM gének promóterei következetesen eltérő felépítésűek, ami arra utal, hogy a három CaM gén expressziója eltérő celluláris szabályozás alatt áll. Ezen szabályozás megismerése történhet a szabályzóelemek működésének biokémiai módszerekkel történő jellemzésével, valamint a CaM gének kifejeződésének funkcionális vizsgálatával, azaz a változó körülményekre adott expressziós válaszaik mérésével és elemzésével is.

(c) Az egyes CaM gének expressziója eltérő változásokat mutat különböző körülmények között

A három CaM gén élettani körülmények között mért expressziójának erőssége és arányai eltérőek a felnőtt gerincesek különböző szöveteiben (Ikeshima és mtsai., 1993), és szöveti régióiban (Solà és mtsai., 1996). Emellett a CaM gének kifejeződése eltérő mértékű változásokat mutat a normál egyedfejlődés (Berry és Brown, 1995; Cimino és mtsai., 1990; MacManus és mtsai., 1989) és a differenciálódás alatt is (Bai és Weiss, 1991).

Számos vizsgálat igazolta, hogy a CaM gének kísérletileg előidézett külső stimulusokra különböző expressziós változásokkal válaszolnak (Barrón és mtsai., 1995; Gannon és McEwen, 1994; Michelhaugh és mtsai., 1998; Palfi és Gulya, 1999; Shimizu és mtsai., 1997; Solà és mtsai., 1997); sajnos, az eddigi vizsgálatokban tapasztalt változások csak ritkán mutattak olyan szabályszerűségeket, amelyek segíthetik általános következtések levonását. Ennek ellenére a CaM gének kifejeződésének különböző élettani és kísérleti körülmények között, valamint az egyedfejlődés folyamán megfigyelhető eltérő változásai egyértelművé tették, hogy a három CaM gén expressziója valóban egymástól független szabályozás alatt áll.

Összefoglalva, a gerincesek genomjában működő CaM gének mind transzkriptumaik intracelluláris lokalizációját, mind cisz-szabályzó régióik felépítését, mind expressziós szabályozásukat tekintve különböznek egymástól. A három CaM gén eltérő körülmények között játszott szerepének megértését az gátolja, hogy nem vagy kevéssé ismert(ek)

- (a) az egyes CaM gének szabályozásáért felelős molekuláris mechanizmusok,
- (b) az egyes CaM gének expressziós változásai különböző körülmények között, és
- (c) az egyes CaM-mRNS osztályok mennyiségbeli arányai megváltozásának jelentősége.

Kísérleteinkben az intracelluláris Ca^{2+} -jelátvitelt alapvetően befolyásoló külső stimulust, krónikus etanolkezelést és etanolmegvonást alkalmazva vizsgáltuk a három CaM gén expressziós válaszait patkányagyi régiókban, az egyes mRNS-osztályok mennyiségi változásainak meghatározásával.

A krónikus etanolkezelés és -megvonás

Az etanolról régóta ismert, hogy alapvető változásokat okoz az idegsejtek működésében. Az akut etanolkezelés a transzmembrán ionegyensúly eltolódását, ezen belül a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csökkenését idézi elő. Ezen változások következménye a nyugalmi membránpotenciál csökkenése, és ezen keresztül az idegsejtek ingerlékenységének mérséklődése is (Diamond és Gordon, 1997). Az etanol hatásmechanizmusának feltárására irányuló kísérletek eleinte az etanolnak a sejtmembrán fluiditását és lipidösszetételét befolyásoló hatására koncentráltak, mert akkor már ismert volt a membránfehérjék működésének a lipidkörnyezettől való függése (Diamond és Gordon, 1997). Mára azonban az ezirányú kutatás főként a jelátvitelben szerepet játszó fehérjékre fókuszálódik, mivel azóta számos fehérjéről sikerült igazolni, hogy az etanol közvetlenül befolyásolja szerkezetét, illetve működését. Az etanol célfehérjéi közé tartoznak olyan, a neuronális ingerlékenység alakításában fontos szerepet játszó fehérjék, mint a plazmamembrán különböző receptorai (NMDA-, kainát-, nikotin-típusú acetilkolin-, α - és β -adrenerg-, szerotonin-, ópiát-, GABA_A - és glicin-receptorok), ioncsatornái és ionpumpái (feszültségfüggő Na^+ - és Ca^{2+} -csatornák, Na^+ , K^+ -ATPáz és Ca^{2+} -ATPáz), valamint a transzmembrán jelátvitel egyes enzimeit (például foszfolipáz A_2 és adenilil-cikláz) (Chandler és mtsai., 1998; Diamond és Gordon, 1997; Hamoudi és mtsai., 1995).

Az etanol hatásának folyamatosan kitett idegsejtekben adaptív változások következnek be. Ezek a fiziológiás viszonyokra jellemző működés visszaállítását célozzák, vagyis az idegsejtek ingerlékenységének növelése irányába hatnak (Chandler és mtsai., 1998). A krónikus etanolexpozíciót követő megvonás – az adaptív változások következményeként – az idegsejtek szintjén túlműködést vált ki. Ezt a viselkedés szintjén jellegzetes rohamok

megjelenése kíséri. A túlzott ingerlékenység csökkentésére számos, gyakran az adaptív folyamatokkal ellentétes irányú változás jelentkezik a celluláris folyamatokban a megvonás kezdeti időszakában.

Az etanol akut hatása érinti a CaM fehérjét is: megváltoztatja a membrán-asszociált és a szolubilis CaM fehérjék arányát (Hamoudi és mtsai., 1995). Ez döntően befolyásolhatja a CaM-nak a lokális folyamatok irányításában betöltött szabályozó szerepét, például az ioncsatornák szabályozását. A CaM membrán-asszociációjának megváltozása módosíthatja a CaM transzlokációra épülő távolsági intracelluláris jelátvitelt, és ennek révén a transzkripcionális szabályozást is (Deisseroth és mtsai., 1998). Az élettani körülményekre jellemző CaM aktivitás visszállítása érdekében adaptációs változások következhetnek be a CaM működésének szabályozásában, így a CaM génexpresszióban is. Ugyanakkor az etanolkezelés a Ca^{2+} -jelátvitelre kifejtett hatása révén módosíthatja számos Ca^{2+} -függő szabályozó faktor működését, közvetlenül is befolyásolva a CaM génexpressziót. Az expressziós változások a CaM mRNS-ek célzott transzportja, és az azt követő domén-specifikus transláció révén módosíthatják a CaM fehérje, és így a CaM aktivitás intracelluláris lokalizációját.

A Hmax érték számítása

A CaM gén működésének vizsgálata során a CaM mRNS-osztályok regionális mennyiségeinek relatív változásait *in situ* hibridizációs (ISH) technikával határoztuk meg számos agyterületen. A vizsgálathoz sok metszetet kellett hibridizálnunk, ezért a hibridizációknál olyan cRNS próbakonzentrációt használtunk, amely nem biztosította a sejtekben magas kópiaszámban előforduló CaM mRNS szekvenciák cRNS próbákkal való telítődését. A relatív kvantitáláshoz céljából végzett ISH kísérletekben általános a nem-telítési cRNS próbakonzentráció használata. Ugyanakkor a jelölődési értékek nem-telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásairól nem igazolt, hogy szövetben végzett hibridizációk esetén is híven tükrözik a telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásokat.

Az agyterületek abszolút mRNS-tartalmának becslését egy másik tényező akadályozta. Nem állt rendelkezésünkre olyan módszer, ami lehetővé tette volna a heterogén szöveti szerkezettel rendelkező agyszövetben az egyes agyterületekre jellemző mRNS-tartalmak pontos és egyidejű becslését nem-telítési cRNS próbakonzentrációnál mért hibridizációs jelölődésekből. A fenti problémák megoldására a kvantitatív ISH technika lehetőségeit kibővítő módszertani fejlesztéseket végeztünk.

A biomolekulák kvantitálása nélkülözhetetlen az egyedfejlődési, élettani és kóreléleti változásokban szerepet játszó sejtfolymatok felderítésében. Ha a kvantitáláshoz csak kis mennyiségű szöveti minta áll rendelkezésre, akkor – a hagyományos *ex vivo* kvantitálási módszerek jelentős fejlődése ellenére is (Barron, 1989; Meier és mtsai., 1991) – előnyt élveznek az olyan szövettani technikák, mint az immunhisztokémia vagy az ISH. Annak ellenére, hogy ezek a eljárások rendelkeznek azzal a felbecsülhetetlen előnnyel, hogy úgy teszik lehetővé a célmolekulák kvantitálását, hogy közben megőrzik a szöveti eloszlást, a kvantitatív szövettani vizsgálatok nem túl gyakoriak. Ennek az egyik lehetséges oka az az általános vélekedés, miszerint az ilyen módszerek megbízhatósága nem hasonlítható a hagyományos *ex vivo* vizsgálatokéhoz. Ezt a kérdést számos kísérletben vizsgálták, amelyekben végül is igazolták a hisztológiai módszerekkel nyert kvantitatív eredmények helyességét, gyakran hagyományos blot eljárásokból származó adatokat használva viszonyítási alapnak (Guiot és Rahier, 1995; Huang és mtsai., 1996; Jonker és mtsai., 1997; Sherman és mtsai., 1986; Wicht és mtsai., 1999). A kvantitatív szövettani módszerek elterjedését gátló másik fő tényező az igazolt, összehasonlítható eredményeket biztosító, és széles körben elfogadott kvantitálási módszerek ritka volta. Ez különösen nyilvánvaló az olyan célmolekulák kvantitálása esetén, amelyek kis mennyiségű szöveti mintában (például sebészeti biopsziák) vagy inhomogén szerkezetű szövetben (például idegszövet) fordulnak elő. Az ilyen típusú mintákra nézve a közepes/kis mennyiségű nukleinsav célmolekulák kvantitálásával kapcsolatos problémákat már részletesen vizsgálták (Conn, 1989; Eberwine és mtsai., 1994), de kevesebb figyelmet szenteltek a közepes/nagy mennyiségű mRNS-ek kvantitálásával járó nehézségeknek.

A [³⁵S]-cRNS próbákat előszeretettel használják kvantitatív ISH-hoz előnyös tulajdonságaik – érzékenyséjük, specificitásuk és sejtszintű felbontásuk – miatt. A cél-mRNS-ek abszolút értelemben történő kvantitálása esetén előfeltételnek tekintik a célszekvenciák jelölt nukleinsav-próbákkal történő telítését. Nagyléptékű kísérletek és/vagy közepes/nagy mennyiségű cél-mRNS-ek kvantitálása esetén azonban a fenti feltétel nehezen teljesíthető [³⁵S]-cRNS próbák használatával, mert a magas specifikus aktivitású cRNS próbák nagy moláris mennyiségének szintézise jelentős gyakorlati nehézségeket okoz. A nagy specifikus aktivitású próbák használatát az inhomogén szövetek olyan régióinak kvantitálása teszi szükségessé, amelyek viszonylag kis mennyiségben tartalmazzák a cél mRNS-t. Az adott kísérleti körülmények között elérhető maximális hibridizációs jel számítására szolgáló matematikai eljárás alkalmazásával azonban elkerülhető a nagy mennyiségű cRNS próba használata. Ahhoz, hogy a maximális hibridizációs jel számítható legyen abból a jelből, amely akkor mérhető, amikor a célszekvenciáknak csak egy része hibridizál, a maximális hibridizációs jeleket kalibrálni kell a mért jelölődési értékekhez. Egy ilyen kalibrációs grafikon készítésével járó nehézségek a

cél-szekvenciákat tartalmazó közegnek megfelelően változnak. (a) Ha a cél-szekvenciák oldatban vannak, akkor minden célmolekula hozzáférhetősége azonos, így csak egy telítési grafikont kell készíteni. Ez a grafikon könnyen kalibrálható, mert a maximális hibridizációs jel közvetlenül megfeleltethető a cél-mRNS-ek abszolút mennyiségének, ami független módszerekkel (például spektrofotometriával vagy fluorimetriával) egyszerűen mérhető. (b) A membrán blotok esetére – gyakorlati szempontból – ugyanez a helyzet feltételezhető. (c) Egyedi sejtek esetében feltehető, hogy a hasonló típusú sejtekben az mRNS-ek hozzáférhetősége azonos. A számítási módszerrel kapcsolatosan publikáltak egy explicit elméletet (Cash és Brahic, 1986), amely egyedi sejtekben jelen lévő virális cél-szekvenciák telítését írja le a próbakoncentráció és a telítési idő függvényében. A kvantitáláshoz a telítési görbe kvázi-lineáris részét használták kalibrációs egyenesként, és a mért jelet virális RNS dot blot skálához viszonyították. (d) A (kvázi)-homogén szövetek esetében szintén feltételezhető, hogy a célszekvenciák hozzáférhetősége nem változik sejtről sejtre. Erre az esetre szívizomban írtak le egy módszert (Nunez és mtsai., 1989), amelyben a telítési görbe kvázi lineáris részének meredekségét használták a számításhoz, és Northern blot-ot használtak független eljárásként. (e) Heterogén szerkezetű szövetekben a cél-mRNS-ek hozzáférhetősége, és így telítődési üteme (a telítési jel változása a próbakoncentráció vagy a hibridizációs idő függvényében) eltérő lehet a szövet különböző részeiben, ezért az egyes szöveti régiókhoz külön kalibrációs grafikonokra lehet szükség. Ismereteink szerint még nem publikáltak olyan módszert, amely lehetővé tenné egy heterogén szövet esetében az egyedi régióknak megfelelő maximális hibridizációs jelek egyidejű kiszámítását. Hasonlóképpen, heterogén szövetben az egyes telítési görbéknek az egyedi régiókban jelen lévő (és független módszerrel meghatározott) mRNS-mennyiségekhez történő kalibrációja továbbra sem megoldott.

Jelen vizsgálatunkban a jelölődési értékeket [^{35}S]-cRNS próba ISH kópiaszám/ mm^2 egységben kifejezett moláris mennyiségekké alakítottuk át a pontos szöveti háttérkorrekció érdekében (az ISH kópiaszám érték definícióját lásd *Az abszolút kvantitálás: a cRNS próba kópiaszám érték és az mRNS mennyiség viszonya* című alfejezetben). Ennek megfelelően, a maximális hibridizációs jeleket maximális hibridizációs kapacitásokká (H_{max} érték, ISH kópiaszám/ mm^2 egységben) konvertáltuk. Egy adott szöveti régió H_{max} értékét a [^{35}S]-cRNS próbának azon maximális moláris mennyiségeként definiáltuk (ISH kópiaszámban kifejezve), amely a régió egységnyi (1 mm^2 -nyi) területén az alkalmazott kísérleti körülmények között hibridizált.

CÉLKITŰZÉSEK

Célül tűztük ki a patkányban működő CaM gének expressziós szabályozásának vizsgálatát. Ehhez a krónikus etanolkezelést és -megvonást, mint kísérleti stimulusokat kívántuk alkalmazni. Célunk volt a CaM I, CaM II és CaM III mRNS-eknek a stimulusok hatására bekövetkező mennyiségi változásainak relatív kvantitálása a patkányagy számos területén. A kvantitálást a CaM mRNS-osztályokra specifikus cRNS próbák segítségével kívántuk végezni. Igazolni kívántuk a nem-telítési cRNS próbakonzentrációt alkalmazó kvantitatív ISH módszer használatának jogosságát. További célunk egy olyan eljárás kifejlesztése volt, amely lehetővé teszi egy heterogén szövet egyes régióira az adott kísérleti keretek (azaz a szövet, a cél-szekvencia, a nukleinsav-próba, és a kísérleti protokoll egy meghatározott kombinációja) között jellemző Hmax értékek számítás útján történő meghatározását. A kísérletünkben alkalmazott modellrendszerben a szöveti régiók szerepét a patkányagy egyes területei, a cél-szekvencia szerepét az agyban expresszált CaM mRNS-ek, a nukleinsav-próbák szerepét pedig a génspecifikus CaM cRNS próbák töltötték be. Célkitűzéseinket az alábbiakban foglaljuk össze.

1. Génspecifikus CaM I, CaM II és CaM III cRNS próbák tervezése és elkészítése.

2. A krónikus etanolkezelés és -megvonás hatására a CaM I, CaM II, és CaM III mRNS-ek regionális mennyiségeiben bekövetkező változások relatív kvantitálása patkányagyban. A CaM gének expressziós szabályozásában mutatkozó különbségek jellemzése.

3. A krónikus etanolkezelésre és az etanolmegvonásra a CaM mRNS-ek szignifikáns mennyiségi változásával válaszoló agyterületek meghatározása és összehasonlítása egy-egy CaM gén esetében, illetve mindhárom CaM gén adatait összevetve. Az etanolkezelésre és -megvonásra reagáló agyterületek által kijelölt funkcionális idegi rendszerek azonosítása, és összevetése az etanol hatására más kísérletekben érzékenynek bizonyult rendszerekkel.

4. A CaM I, CaM II, és CaM III mRNS-eknek a génspecifikus CaM cRNS próbákra vonatkozó, agyterületenkénti disszociációs konstans (K_d) értékének meghatározása és összehasonlítása.

5. Annak igazolása, hogy a ISH jelölődési értékek nem-telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásai híven tükrözik a telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásokat.

6. A különböző agyterületek Hmax értékeinek – a telítési jel tényleges megmérése nélküli – számítására szolgáló módszer kidolgozása és tesztelése.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletekhez felhasznált vegyszerek molekuláris biológiai tisztaságúak voltak. A vegyszereket és az enzimeket a következő forrásokból szereztük be: Amersham, Arlington Heights, IL, USA; Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország; Promega, Madison, WI, USA; Sigma, St Louis, MO, USA.

Kísérleti állatok és szövetpreparálás

Az állatkísérletek során a kísérleti állatok gondozása és felhasználása az Európai Közösség Tanácsa irányelveinek (86/609/EEC) és a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998 és 243/1998) megfelelően, az intézményi etikai bizottság engedélyével történt. A kísérletekhez standard körülmények között tartott hím Sprague-Dawley patkányokat (*Rattus rattus*) használtunk. A krónikus etanolkezeléshez az állatokat három, egyenként öt állatból álló csoportra osztottuk. Az etanolos és a megvonásos csoport három hétig csak 5,0 % (w/v) etanolt tartalmazó folyékony tápot (Liquid Rat Diet, LD'82; BioServ, Frenchtown, NJ, USA) fogyaszthatott *ad libitum*, míg a kontroll csoport ezalatt izokalorikus kontroll folyadéktápot kapott. A megvonásos csoport folyékony etanolos tápját az állatok feláldozása előtt 12 órával kontroll folyadéktápra cseréltük. Az állatok átlagos súlya 224 ± 13 g volt a kezelés előtt, és 293 ± 23 g-ra nőtt a harmadik hét végére. Az állatok átlagos súlygyarapodása 30,5 % volt a kontroll, 31,5 % az etanolos és 30,7 % a megvonásos csoportban (szignifikánsan nem különböző értékek a Student-féle t-teszt szerint, $p < 0,05$). Az állatokat a háromhetes kísérleti kezelés után áldoztuk fel. A módszertani kísérletekhez 260 ± 10 g súlyú hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk.

Az állatokat éteres altatásban dekapitáltuk, majd az agyukat gyorsan eltávolítottuk, Cryomatrix beágyazóanyagba ágyaztuk (Shandon Scientific, Pittsburgh, PA, USA) és -70°C -on azonnal megfagyasztottuk. Az agyakból $15\ \mu\text{m}$ vastag koronasíkjú kriosztát metszeteket készítettünk. A metszést a bregmától számított $-1,4$, $-3,14$, $-4,3$ és $-10,8$ mm-es síkokban (Paxinos és Watson, 1986), illetve a módszertani kísérletekben a bregmától számított $-3,14$ és $-3,6$ mm-es síkok között végeztük. A metszeteket Cr-Al-zselatinnal bevont tárgylemezekre vettük fel és száradás után további felhasználásig -70°C -on tároltuk.

Az agypaszta standard skálák készítéséhez használt agyakat a Standard skálák című alfejezetben leírtaknak megfelelően dolgoztuk fel.

cRNS próbák

A cRNS próbák megtervezését annak módszertani jellege miatt itt tárgyaljuk. A tervezés során számos szempontot kellett figyelembe vennünk; ezek az alábbiak voltak.

(a) A cRNS próbák specificitása

A patkány CaM mRNS-ek régiói közül a legkisebb hasonlóságot a 3' nemkódoló régiók mutatják, ezért a keresztreakciók (más mRNS-osztályokba tartozó CaM mRNS-ek felismerésének) elkerülésére a cRNS próbák cél-szekvenciáit ezen szakaszokon belül választottuk ki. Annak érdekében, hogy egy adott cRNS próba felismerje valamennyi, az adott CaM mRNS-osztályba tartozó – de a különböző poliadenilációs szignálok használata miatt eltérő hosszúságú – cél-mRNS fajtát, a cRNS próbák tervezésekor a 3' nemkódoló régióknak csak az első poliadenilációs szignálig terjedő szakaszait használtuk.

(b) A cRNS próbák hossza és az *in situ* hibridizáció érzékenysége

A cRNS próbák hosszának növelésével egy határig növelhető az ISH módszer érzékenysége; ezen túl a cRNS próbák csökkenő permeálása következtében az ISH érzékenysége is csökken. Ezért a cRNS próbákat olyanra terveztük, hogy szintetizált hosszuk kisebb legyen, mint 300 bp, hibridizáló szakaszuk pedig legalább 100 bp hosszúságú legyen.

(c) A klónozással kapcsolatos szempontok

A PCR termékek klónozását megkönnyítendő, a primerek 5' végeihez az alkalmazott vektor promótereit által határolt klónozó szakaszban előforduló restrikciós enzim hasítóhelyeket illesztettünk. Mivel a 3' és a tompa véggel rendelkező templát esetén az RNS polimeráz a mindkét szálát átírhatja (Schenborn és Mierendorf, 1985), ezért két, 5' véget hasító restrikciós enzim (EcoR I és BamH I) hasítóhelyeit választottuk ki, és ezeket illesztettük a primerek 5' végeihez. Mivel a restrikciós enzimek nem hasítanak megfelelően, ha a hasítóhelyük közvetlenül a DNS fragment végén található, így a hasítóhelyek 5' végeihez még egy további, 4 bp hosszúságú szakaszt terveztünk.

(d) A PCR-el kapcsolatos szempontok

A primernek alkalmas CaM szekvenciák és a hozzáadott rövidebb szakaszok (a

restrikciós enzim hasítóhelyek és a 4 bp-os szekvenciák) kiválasztásakor ügyeltünk arra is, hogy azok ne képezzenek stabil másodlagos (hajtű vagy dimer) szerkezeteket a PCR-nél alkalmazott hőmérsékleteken. Emellett a primerek 3' végeinek kialakításakor figyelembe vettük azok szabadentalpia-változás értékeit [dG (kJ/mol)] is (túl kis dG érték esetén az 3' primervégek leválhatnak a célszekvenciáról, ami akadályozza a sikeres PCR reakciót); arra is ügyeltünk, hogy a kiválasztott primer-párok olvadáspont értékei (T_m) közötti különbség ne legyen jelentős.

A cRNS próbák előállításához genomikus DNS-t izoláltunk patkányagyból (Sambrook és mtsai., 1989). Az agyszövetet DNS extrakciós pufferben [10 mM tris-hidroximetil-aminometán (Tris), 2 mM etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA), 10 mg/ml ditiotritol (DTT), 0,5 mg/ml proteináz K, 0,1 % (w/v) nátrium-laurilszulfát (SDS), pH 8,0] homogenizáltuk, 37 °C-on 90 percig inkubáltuk, majd fenol:kloroform:izamilalkohol eleggyel (25:24:1, Tris-telített, pH 8,0) extraháltuk. A genomikus DNS-t 0,1 térfogat nátrim-acetát (NaOAc) és 3 térfogat etanol hozzáadásával precipitáltuk -70 °C-on, éjszakán keresztül. A precipitált DNS-t centrifugáltuk, 70 %-os (v/v) etanolban mostuk, szárítottuk, majd 1 × TAE pufferben (40 mM Tris, 20 mM ecetsav, 1 mM EDTA, pH 8,0) feloldottuk. A genomikus DNS koncentrációját ill. tisztaságát UV-spektrofotometriával (GeneQuant, Pharmacia), a 260 nm-en mért abszorbanciából, ill. a 260 és 280 nm-en mért abszorbanciák hányadosából határoztuk meg.

A CaM I, CaM II és CaM III mRNS-ek 3'-nemkódoló régióinak megfelelő genomikus szekvenciákat (Nojima és Sokabe, 1987; Nojima, 1989) polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk. A PCR-ekhez EcoR I és BamH I restrikciós enzim hasítóhelyekkel kiegészített primereket használtunk. A patkány genomikus DNS-el komplementer primer szekvenciák a következők voltak: a CaM I esetében 5'-AGACCTACTTTCAACTACT, amely a 30-48 bp-ig terjedő szekvenciának és 5'-TGTA AAACTCATGTAGGGG, amely a 236-254 bp-ig terjedő szekvenciának felel meg a 6. exonon belül (Nojima és Sokabe, 1987); a CaM II esetében 5'-ATTAGGACTCCATTCCTCC, amely a 144-162 bp-ig terjedő szekvenciának (számozása 1929-1947) és 5'-CACA ACTCCACACTTCAACAGC, amely a 353-374 bp-ig terjedő szekvenciának (számozása 2138-2159) felel meg a 5. exonon belül (Nojima, 1989); és a CaM III esetében 5'-ATGATGACTGCGAAGTGAAG, amely a 12-31 bp-ig terjedő szekvenciának (számozása 7058-7077) felel meg a 6. exonon belül és 5'-CAGGAGGAAGGAGAAAGAGC, amely a stop kodontól számított és 3' irányban 153-172 bp-ig terjedő (számozása 7228-7247) nem-expresszáldó genomikus szekvenciának felel meg (Nojima, 1989). A PCR elegyek 1,5 mM MgCl₂-ot, 30 μM dezoxi-ribonukleotid-trifoszfát (dNTP) elegyet, 400 ng genomikus DNS templátot és 20-20 pmol 5' és 3' primert

tartalmaztak. A PCR-eket 35 cikluson keresztül futtattuk; minden ciklus egy 94 °C-on 40 mp-ig tartó denaturációs, egy 55 °C-on 30 mp-ig tartó kötődési, és egy 72 °C-on 30 mp-ig tartó extenziós fázisból állt. A sikeres PCR-ek azonosításához a PCR elegyekből mintákat vettünk, és azokat 2 %-os (w/v) agaróz gélen választottuk el (Horizon 58, Horizontal Gel Electrophoresis System; Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Az elektroforézist 0,5 % etídium-bromidot tartalmazó 1 × TAE pufferben, 4,2 V/cm feszültség alatt, szobahőn, 50 percig végeztük. A vizualizáláshoz 312 nm-es hullámhosszú ultraibolya (UV) megvilágítást alkalmaztunk (Transilluminator 4000; Stratagene, La Jolla, CA, USA). A PCR termékek hosszát pUC19/Mop DNS marker segítségével meghatároztuk, és a várt hosszúságú PCR termékeket tartalmazó PCR elegyeket génenként egyesítettük. A PCR termékek tisztítását extrakcióval, precipitációval és preparatív gélelektroforézissel végeztük. A preparatív gélelektroforézishez alacsony olvadáspontú (LMP) agarózból készült, 1 %-os (w/v) gélrt használtunk. Az elektroforézis után a PCR termékeket tartalmazó gélrészecskéket UV megvilágítás mellett kivágtuk a gélből, és AgarACE enzimmel (Promega), a gyártó utasításait követve izoláltuk belőlük a PCR termékeket. Ezután a PCR termékeket extrakcióval és precipitációval tisztítottuk, majd feloldottuk steril desztillált vízben és meghatároztuk a tisztaságukat, valamint a koncentrációjukat.

Az ellentétes végeiken EcoR I és Bam H I restrikciós enzim hasítóhelyeket hordozó PCR-termékeket, és a fenti hasítóhelyeket a klónozó szakaszában hordozó pcDNA3 vektort (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) EcoR I / BamH I enzimekkel végzett (Promega) kettős emésztésnek vetettük alá (37 °C, 4 óra). Az emésztés után az enzimeket inaktiváltuk (65 °C, 15 perc), majd a PCR termékeket és a vektort preparatív gélelektroforézis, extrakció és precipitáció segítségével tisztítottuk meg a keletkezett rövidebb DNS fragmentektől. A hamis pozitív klónok számának minimalizálása érdekében a kettős emésztéssel linearizált pcDNA3 vektor szabad végeit defoszforiláltuk (37 °C, 45 perc) marha intesztinális foszfátázzal (CIP; Promega). A CIP-et inaktiváltuk (56 °C, 30 perc), majd a vektort extrakcióval és precipitációval tisztítottuk. A kettős emésztett PCR termékeket a kettős emésztett és defoszforilált pcDNA3 vektorba ligáltuk (15 °C, 3 óra, majd 4 °C, éjszakán át) T4 DNS ligázzal (Promega). A ligátummal nagy transzformációs hatékonyságú JM109-es *Escherichia coli* sejteket (Promega) transzformáltunk hősokk alkalmazásával (42 °C, 50 mp, majd jeges hűtés). A sejteket 60 µg/ml végkoncentrációjú Ampicillint (Sigma) tartalmazó LB agar (Sigma) táptalajon tenyésztettük 12-16 órán át (mivel a pcDNA3 vektor Ampicillin rezisztencia gént hordoz, így a transzformált sejtek rezisztenssé váltak az Ampicillinnel szemben). A klónokból vett inokulátumokkal baktériumtenyészeteket indítottunk 60 µg/ml végkoncentrációjú Ampicillint tartalmazó LB médiumban (Sigma). A tenyészeteket erősen rázatva (250 rpm) inkubáltuk 37 °C-on éjszakán át. A baktériumtenyészetekből Wizard

Minipreps rendszer (Promega) segítségével, a gyártó utasításai szerint izoláltuk és tisztítottuk a vektort. A vektorokat tartalmazó oldatokból mintákat vettünk, majd ezeken EcoR I és BamH I enzimmal kettős emésztést végeztünk. A reakcióelegyekből vett mintákat agaróz gélelektroforézissel elválasztva vizsgáltuk, hogy az adott klón tartalmazza-e a PCR terméknek megfelelő hosszúságú inzertet. Az pozitív klónok esetében az inzert azonosságát szekvenálással ellenőriztük (AB 373 DNA Sequencer; PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Az antiszensz és szensz cRNS próbák in vitro transzkripcióval történő szintéziséhez EcoR I, vagy BamH I enzimmal linearizált (37 °C, 4 óra), és tisztított vektorokat használtunk templátként. A cRNS próbák radioaktív jelölését Riboprobe System-T7 és Riboprobe System-SP6 (Promega) rendszerekkel, a gyártó utasításait követve végeztük. A radioaktív jelöléshez használt nukleotid [³⁵S]-UTPaS (1250 Ci/mmol; ICN Biomedicals; Costa Mesa, CA, USA) volt. A cél-mRNS-el komplementer szekvencia a CaM I esetében 225 bp, a CaM II esetében 231 bp, a CaM III esetében pedig 157 bp hosszúságú volt. A radioaktívan jelölt cRNS próbákat ProbeQuant G-50 Sephadex mikrooszlopokon (Pharmacia) méretkizárásos kromatográfiával tisztítottuk, majd folyadékszintillációs számlálás (LSC) segítségével határoztuk meg a cRNS próbák specifikus aktivitását. A krónikus etanolkezelés és -megvonás hatását vizsgáló kísérletekben a cRNS próbák specifikus aktivitása a $3,3 \times 10^7$ cpm/pmol-tól $6,7 \times 10^7$ cpm/pmol-ig terjedő tartományba esett (a cpm rövidítés a detektált másodpercenkénti radioaktív bomlások számát jelöli). A módszertani kísérletekben az antiszensz cRNS próbák komplementer szekvenciájának specifikus aktivitása $6,6442 \times 10^7$ cpm/pmol ($9,3047 \times 10^8$ cpm/μg) volt a CaM I, $4,6095 \times 10^7$ cpm/pmol ($6,1837 \times 10^8$ cpm/μg) volt a CaM II, és $3,1236 \times 10^7$ cpm/pmol ($6,1561 \times 10^8$ cpm/μg) volt a CaM III esetében. A szintetizált CaM I, CaM II és CaM III szensz cRNS próbák specifikus aktivitása rendre $6,7063 \times 10^7$ cpm/pmol, $7,6421 \times 10^7$ cpm/pmol és $5,6726 \times 10^7$ cpm/pmol volt. A cRNS próbák specificitását BLASTN 2.0.6. szoftverrel (Zhang és Madden, 1997) végzett szekvenciaillesztéssel, Northern blot analízissel, és ISH-val igazoltuk (Palfi és mtsai., 1999).

Standard skálák

A membrán standard skálákat a korábban leírtaknak megfelelően készítettük el (Palfi és mtsai., 1998). Méretkizárásos kromatográfiával tisztított [³⁵S]-cRNS próbából 12 tagú hígítási sort készítettünk. A hígítást RNáz-mentes vízzel végeztük; az egyes oldatok specifikus aktivitását LSC-vel határoztuk meg. Mindegyik hígításból 50 μl-t vittünk fel Duralon-UV nylon membránra (Stratagene) vákumszűrést alkalmazó dot blot technikával (Minifold;

Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA). A membránokat ezután UV-keresztalkotással fixáltuk ($120\,000\ \mu\text{J}/\text{cm}^2$; Stratalinker; Stratagene, USA), majd $37\ ^\circ\text{C}$ -on 30 percig szárítottuk. A membrán standard skálák végső aktivitási tartománya $1,5\ \text{cpm}/\text{mm}^2$ -től $305,5\ \text{cpm}/\text{mm}^2$ -ig terjedt.

Az agypaszta standardok készítéséhez a *Kísérleti állatok és szövetpreparálás* című alfejezetben ismertetett módon izolált agyakat egy korábban leírt eljárás szerint dolgoztuk fel (Davenport és mtsai., 1988; Palfi és mtsai., 1998). A lemosott és letörölt agyakat $4\ ^\circ\text{C}$ -on homogenizáltuk, majd 2 ml-es mikrocentrifuga-csövekben 500 mg agypasztát kevertünk el 10 perces vortexeléssel $30\ \mu\text{l}$ -nyi desztillált vízzel, ami ismert mennyiségű cRNS próbát tartalmazott. Ezután az agypasztákat $-70\ ^\circ\text{C}$ -on megfagyasztottuk, majd eltávolítottuk az agypaszta-hengereket a mikrocentrifuga-csövekből és Cryomatrix beágyazóanyagba (Shandon) ágyaztuk. Az agypasztákból a patkányagy-metszetekkel megegyező vastagságú ($15\ \mu\text{m}$ vastag) kriosztát metszeteket készítettünk, amelyeket Cr-Al-zselatinnal bevont tárgylemezre vettünk fel, majd megszárítottunk. A metszés során egyes kiválasztott metszeteket elkülönítettünk, és radioaktivitásukat LSC-vel meghatároztuk. A hozzávetőlegesen feleződő aktivitási szintekből felépülő agypaszta standard skála a $2,2$ - $5280,0\ \text{cpm}/\text{mm}^2$ -ig terjedő aktivitási tartományt fedte le.

Az agypaszta skálákat a membrán skálákkal, a membrán skálákat pedig az agypaszta skálákkal vagy a hibridizált patkányagy-metszetekkel együtt foszforernyőkre exponáltuk.

In situ *hibridizáció*

A koronális patkányagy-metszeteket 4 % formaldehidet tartalmazó $2 \times \text{SSC}$ -ben ($0,3\ \text{M}\ \text{NaCl}$ és $0,03\ \text{M}\ \text{Na-citrát}$, pH 7,0) fixáltuk szobahőn 5 percig, majd $2 \times \text{SSC}$ -ben tartottuk szobahőn 2×1 percig. Ezután 0,25 % (v/v) ecetsavanhidridet és 0,9 % (w/v) NaCl-ot (pH 8,0) tartalmazó 0,1 M trietanolamin-oldattal kezeltük a metszeteket szobahőn 5 percig. Ezt követően a metszeteket dehidráltuk, megszárítottuk, majd befedtük $50\ \mu\text{l}$ hibridizációs oldattal, ami hibridizációs pufferből és az ebben oldott cRNS próbából állt. A hibridizációs puffer összetétele 50 % formamid, $6 \times \text{SSPE}$ ($0,75\ \text{M}\ \text{NaCl}$, $60\ \text{mM}\ \text{NaH}_2\text{PO}_4$, és $6\ \text{mM}\ \text{EDTA}$, pH 7,4), $5 \times \text{Denhardt reagens}$ [0,1 % (w/v) marhaszérum albumin (BSA), 0,1 % (w/v) Ficoll, és 0,1 % (w/v) polivinil-pirrolidin (PVP)], 10 % (w/v) dextrán-szulfát, 50 mM dithiotreitol (DTT), $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ heringsperma DNS, és $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ élesztő tRNS volt. A krónikus etanolkezeléssel kapcsolatos kísérletekben a hibridizációs oldatok LSC-vel meghatározott specifikus aktivitása a 141 - $174\ \text{fmol}/\text{ml}$ -ig terjedő tartományba esett. A telítési kísérletekben az antiszensz és a szensz cRNS próbát tartalmazó hibridizációs oldatok cRNS próbakoncentrációja rendre $10,0$ - $2142,1$ és $9,9$ - $2018,4\ \text{fmol}/\text{ml}$ -ig terjedt a CaM I, $10,1$ -

2065,7 és 13,8-2514,7 fmol/ml-ig a CaM II, valamint 1,6-2752,5 és 14,4-2640,1 fmol/ml-ig a CaM III esetében. A módszertani kísérletekben a nem-telítési próbakoncentrációnál végzett hibridizációknál az antiszensz és a szensz cRNS próbák koncentrációja 213,5 és 226,7 fmol/ml volt a CaM I, 212,9 és 269,4 fmol/ml a CaM II, valamint 633,8 és 430,8 fmol/ml CaM III esetében. A hígítási sorok elkészítése és a patkányagy-metszetek lefedése alatt a hibridizációs oldatokat melegen (45 °C-on) tartottuk. A hibridizációt parafilm fedőlemezek alatt, nedves kamrában végeztük 45 °C-on 21±1 óráig. A hibridizáció után a metszeteket 50 % formamidot tartalmazó 2 × SSC-ben mostuk előbb szobahőn 5 percig, majd 50 °C-on kétszer 10 percig. Ezt követően a metszeteket 2 × SSC-ben tartottuk szobahőn 5 percig, majd $1,32 \times 10^{-3}$ Kunitz U (~25 mg fehérje)/ml RNáz A-t tartalmazó 0,5 M NaCl, illetve 1 × TE (0,01 M Tris és 0,001 M EDTA, pH 8,0) oldatban inkubáltuk 37 °C-on 30 percig. Ezután a metszeteket előbb 50 % formamidot tartalmazó 2 × SSC-ben mostuk 50 °C-on 10 percig, majd 2 × SSC-ben tartottuk 50 °C-on 10 percig. Végül a metszeteket dehidráltuk és megszáritottuk.

Autoradiográfia, képanalízis, és mikroszkópia

A krónikus etanolkezelés és -megvonás hatását vizsgáló kísérletekben a hibridizált patkányagy-metszeteket membrán standard skálákkal együtt exponáltuk 20 órán keresztül. A módszertani kísérletekben az agypasza standard skálákat vagy a hibridizált patkányagy-metszeteket membrán standard skálákkal együtt exponáltuk 24, illetve 22 órán át. Az expozíciót SR Cyclone foszforernyőkre (Packard Instrument Company; Meriden, CT, USA), szobahőn végeztük. A foszforernyőkön kialakult képeket Cyclone Storage Phosphor System képalkotó rendszer (Packard) segítségével, 600 × 600 dpi képfelbontással rögzítettük. A detektáló rendszer lineáris érzékenységet a módszertani kísérlet kapcsán igazoltuk (lásd 3. ábra). A digitális képek elemzésére az OptiQuant 3.0 szoftvert (Packard) használtuk. A képeken körülhatároltuk a membrán és az agypasza standard skálák egyes elemeit vagy az egyes agyi régiókat, majd meghatároztuk azok autoradiográfias jelölődésének erősségét területegységre vonatkoztatott digitális fényegység (dlu/mm²) mértékegységben. Ezeket az értékeket korrigáltuk a metszetek területén kívül mérhető háttérjelre (ez az ún. foszforernyő-háttér tipikusan kevesebb volt, mint 6 000, illetve a módszertani kísérleteknél 7 000 dlu/mm²), s a jelölődések erősségét nettó dlu/mm² egységben fejeztük ki.

A krónikus etanolkezeléssel kapcsolatos kísérleteknél a szöveti háttérre a következő módon korrigáltunk. Meghatároztuk a megfelelő szensz cRNS próbával hibridizált

metszetek foszforernyő-háttérre korrigált jelölődési értékeit, és ezeket – a membrán standard skálák segítségével – korrigáltuk a radioaktivitás bomlására. Az így számított értékek átlagát osztottuk a szintetizált szensz cRNS próbában előforduló uridin-5-foszfát nukleotidok számával és szoroztuk az antiszensz cRNS próba hibridizáló szakaszában előforduló uridin-5-foszfát nukleotidok számával. Ezt az értéket vontuk ki az antiszensz cRNS próbával hibridizált agyterületek foszforernyő-háttérre és a radioaktivitás bomlására korrigált jelölődési értékéből. Végeredményként az antiszensz próbával hibridizált agyterületek foszforernyő- és szöveti háttérre, valamint a radioaktivitás bomlására korrigált, nettó dlu/mm² egységben kifejezett jelölődési értékeit kaptuk.

A módszertani kísérleteknél a kvantitálás során a jelölődési értékeket a következő lépések sorozatán keresztül alakítottuk át. Először is feltételeztük, hogy a patkányagy-metszetben és az agypaszta-metszetben azonos koncentrációban előforduló radioaktivitás azonos jelölődési erősséget eredményez mindkét esetben (Kuhar és Unnerstall, 1985). Ez lehetővé teszi az agyterületek nettó dlu/mm² értékeinek agypaszta nettó dlu/mm² értékeként való értelmezését. Ezután az agypaszta standard skálákat a membrán standard skálákhoz kalibráltuk, mindkét skála esetében a cpm/mm² értékek függvényében ábrázolva a nettó dlu/mm² értékeket. Az agypaszta és a membrán standard skálák grafikonjai meredekségeinek (illetve azok arányának) ismeretében az agypaszta nettó dlu/mm² értékeket membrán cpm/mm² értékké konvertáltuk. A membrán cpm/mm² értékeket ezután cRNS próba ISH mol/mm² értékké alakítottuk, figyelembe véve a cRNS próba radioaktivitásának bomlását, és cpm/pmol egységben kifejezett specifikus aktivitását. Ezeket a cRNS próba ISH mol/mm² értékeket megszoroztuk az Avogadro számmal, és az eredményt cRNS próba ISH kópiaszám/mm² egységben [\pm az átlag standard hibája (SEM)] fejeztük ki. A kvantitálási lépések az alábbi egyenletben összegezhetők:

$$RES = (LAB \times AVO) / (LRF \times RDF \times SPA),$$

ahol a RES a cRNS próba ISH kópiaszám/mm² értéket, a LAB a jelölődési erősséget (nettó dlu/mm²), az AVO az Avogadro számot ($6,2252 \times 10^{23}$ kópiaszám/mol), az LRF a membrán standard skálára vonatkozó, a jelölődési erősség és a radioaktivitás viszonyát leíró faktort [(nettó dlu/mm²)/(cpm/mm²)], az RDF a radioaktív bomlási faktort, és az SPA a cRNS próba specifikus aktivitását (cpm/pmol) jelöli.

A módszertani kísérletek esetében a szöveti háttérkorrekciót a cRNS próbák specifikus aktivitásának figyelembevételével végeztük. Az antiszensz cRNS próbával hibridizált agyterület foszforernyő-háttérre korrigált jelölődési értékét RES értékévé konvertáltuk, majd korrigáltuk a hasonló koncentrációjú, megfelelő szensz cRNS próbával hibridizált azonos

agyterületek RES értékeinek átlagára. Végeredményként az agyterület szöveti háttérre korrigált (nettó) RES értékét kaptuk cRNS próba ISH kópiaszám/mm² egységben, amit az agyterület cél-mRNS kópiaszám/mm² értékére vonatkozó becslésnek tekintettünk.

Az emulziós autoradiográfiához reprezentatív patkányagy-metszeteket választottunk ki, amelyeket Hypercoat nukleáris emulzióval (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) vontunk be. Az emulzióval bevont metszeteket a CaM I és a CaM II esetében 91 napig, a CaM III esetében 122 napig exponáltuk 4 °C-on. Az expozíció után az előhívást 19 °C-os Kodak D19 hívóval (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) végeztük 5 percig, amit 19 °C-os Kodak fixálóval történő 10 perces fixálás követett. Az emulziós metszeteket Leica DM LB fénymikroszkóppal (Leica Mikroskopie und Systeme; Wetzlar, Németország), sötét látótérben vizsgáltuk. A fénymikroszkópos felvételeket Polaroid DMC 1 digitális mikroszkópkamera (Polaroid, Cambridge, MA, USA) és Power Macintosh 9500/120 személyi számítógép (Apple Computer, Cupertino, CA, USA) segítségével készítettük.

Adatfeldolgozás

A módszertani kísérletekben a telítési görbék készítéséhez és a Hmax értékek kiszámításához a GraFit 3.0 szoftvert használtuk (Leatherbarrow, 1992). A Hmax értéket a cél-mRNS-ek egyetlen osztálya maximális hibridizációs kapacitásaként definiáltuk (cRNS ISH kópiaszám/mm² egységben) és egyszerű/robosztus súlyozással készített telítési görbékből határoztuk meg a következő egyenlet segítségével:

$$y = (H \times L) / (Kd + L),$$

ahol az y a hibridizált [³⁵S]-cRNS próbát (kötött ligand; ISH kópiaszám/mm² egységben), a H a cRNS próba hibridizálására való kapacitást [Hmax érték, ISH kópiaszám/mm² egységben; analóg a ligand kötésére való kapacitással (Bmax)], a Kd a disszociációs konstansot, és az L a nem-hibridizált [³⁵S]-cRNS próba (a szabad ligand) koncentrációját jelöli. A gyakorlatban a telítési görbéket úgy készítettük, hogy egy kiválasztott agyterület 1 mm²-es területén hibridizált cRNS próbák ISH kópiaszámát ábrázoltuk a hibridizációs oldat fmol/ml egységben kifejezett cRNS próbakonzentrációjának függvényében. Meghatároztuk az egy metszetben átlagosan megkötődő cRNS próbamennyiséget. Ez a metszetre felvitt cRNS próbamennyiség kevesebb, mint 2,5 %-ának (a gyakorlat szempontjából reális cRNS próbakonzentrációknál kevesebb, mint 1 %-ának) bizonyult (lásd 5. ábra), így a telítési görbék készítésénél a szabad cRNS próbakonzentráció helyett a totál cRNS próbakonzentrációt használtuk.

Az adatfeldolgozást és a lineáris regressziót IBM PC 300PL személyi számítógépen (IBM, Armonk, NY, USA), Excel 7.0 szoftverrel végeztük (Microsoft, Redmont, WA, USA). A krónikus etanolkezelés és -megvonás hatását jellemző vizsgálatban a kísérleti állatok mindhárom csoportja esetében az egyes agyterületek jelölődési értékeinek átlagát a megfelelő agyterület kontroll csoportban mért jelölődési értékei átlagának százalékában fejeztük ki. A statisztikai analízist heteroszcedasztikus (a két adatcsoport eltérő varianciáját feltételező), kétmintás Student *t*-teszttel végeztük, 0,05-os szignifikancia-határt alkalmazva. Egy adott agyterület kontroll, etanolos, és megvonásos csoportnak megfelelő relatív mRNS-szint értékeit, illetve a módszertani kísérletnél egy adott agyterület telítéssel és számítással meghatározott ISH kópiaszám/mm² értékeit akkor tekintettük különbözőnek, ha a *p* értéke kisebb volt, mint 0,05.

EREDMÉNYEK

A cRNS próbákkal végzett kontroll hibridizációk

A CaM I, CaM II és CaM III cRNS próbák specificitását Northern blot analízissel igazoltuk. A génspecifikus cRNS próbák nem mutattak keresztreakciót más CaM mRNS-osztályokkal, sem nonspecifikus hibridizációt más gének mRNS-eivel. A cRNS próbák a patkányagyban már korábban detektált (Ikeshima és mtsai., 1993) mRNS fajtákat ismerték fel [(Palfi és mtsai., 1999); az adatokat itt nem mutatjuk]. A közepes koncentrációjú szensz próbákkal végzett ISH kísérletek nagyon alacsony szintű jelölődést eredményeztek (lásd 8. ábra D-F). A metszetek RNáz A-val történő előkezelése megakadályozta a hibridizációs jelölődések kialakulását (az adatokat nem mutatjuk).

A kontroll patkányagy-metszeteken a génspecifikus cRNS próbákkal végzett ISH kísérletek a korábban egéragyban leírthoz (Solà és mtsai., 1996) hasonló expressziós mintázatot tártak fel [(Palfi és mtsai., 1999); az adatokat itt nem mutatjuk]. Minden agyterületen megfigyelhető volt mindhárom CaM gén expressziója, de a CaM I, CaM II és CaM III mRNS-eknek megfelelő hibridizációs jelölődés számos agyterületen különböző erősségű volt. Ilyen, a három CaM gén differenciált expresszióját mutató agyterület volt például a globus pallidus, a hippocampus, a gyrus dentatus, a nucleus habenulae medialis, és a cerebellum. Több agyterület, például a cortex cerebri, a hippocampus, valamint a cerebellum esetében is megfigyelhető volt – a három CaM mRNS-osztályt tekintve eltérő erősségű – hibridizációs jelölődés a dendritgazdag neuropil rétegek területén.

A krónikus etanolkezelés és -megvonás hatása a CaM génexpresszióra patkányagyban

Génspecifikus [³⁵S]-cRNS próbák segítségével meghatároztuk a krónikus etanolkezelés, és az azt követő megvonás által a CaM I, CaM II és CaM III mRNS-ek mennyiségében előidézett változásokat a patkányagy számos területén [(Vizi és mtsai., 2000); 1. táblázat]. Az alkalmazott kísérleti stimulus mindhárom CaM mRNS-osztály esetében szignifikáns változásokat okozott a területi mRNS-mennyiségekben. Egységes irányú mRNS-szint változások jellemeztek minden egyes CaM-mRNS osztályt a különböző agyterületeken: a CaM I és CaM III mRNS-ek relatív mennyisége növekedett, míg a CaM II mRNS-eké csökkent az érintett agyterületeken. Ez a szabályszerűség a krónikus etanolkezelés és az etanolmegvonás által kiváltott változásokat egyaránt jellemezte.

1. táblázat: A krónikus etanolkezelés és az azt követő megvonás által a CaM mRNS-osztályok területi mennyiségeiben előidézett változások patkányagyban.

Agyterület	CaM I	CaM II	CaM III
cortex cerebri (2-6. réteg):			
cingularis (a)	100 ± 4,50 96,52 ± 4,85 95,30 ± 6,35	100 ± 6,52 104,90 ± 5,61 105,88 ± 5,97	100 ± 6,37 105,87 ± 6,47 107,36 ± 6,67
frontalis	100 ± 5,13 111,74 ± 4,58 105,77 ± 4,52	100 ± 5,05 108,20 ± 4,20 110,49 ± 2,75	100 ± 7,66 118,21 ± 7,29 115,09 ± 6,75
parietalis (a)	100 ± 4,95 105,48 ± 3,37 108,74 ± 4,71	100 ± 6,02 102,19 ± 3,27 104,77 ± 3,43	100 ± 7,31 111,17 ± 6,51 118,16 ± 7,33
cingularis (b)	100 ± 5,20 95,35 ± 3,03 99,26 ± 6,51	100 ± 4,82 95,84 ± 3,02 90,05 ± 5,44	100 ± 4,17 99,57 ± 7,11 105,33 ± 6,25
parietalis (b)	100 ± 3,76 105,79 ± 2,63 105,08 ± 4,91	100 ± 4,12 95,53 ± 2,42 91,59 ± 3,38	100 ± 4,11 100,35 ± 4,31 108,19 ± 4,79
occipitalis	100 ± 2,97 114,22 ± 3,02 ↑ 117,49 ± 4,09 ↑	100 ± 5,81 103,83 ± 6,42 101,94 ± 4,11	100 ± 3,32 95,45 ± 5,25 109,81 ± 7,28
temporalis	100 ± 3,91 113,81 ± 2,66 ↑ 123,01 ± 3,81 ↑	100 ± 4,43 101,27 ± 6,06 96,52 ± 4,69	100 ± 4,02 101,24 ± 4,73 115,69 ± 5,72
cortex cerebri:			
piriformis	100 ± 2,80 98,36 ± 5,13 121,34 ± 6,42 ↑ ↑	100 ± 4,01 99,14 ± 3,84 102,10 ± 3,73	100 ± 6,91 103,14 ± 6,68 110,48 ± 7,73
basalis ganglionok:			
nucleus caudatus-putamen	100 ± 3,89 103,86 ± 4,26 115,09 ± 4,50	100 ± 5,75 104,73 ± 4,38 ↑ 108,37 ± 3,52	100 ± 7,36 114,93 ± 6,58 116,47 ± 7,84
globus pallidus	100 ± 5,58 105,54 ± 5,48 99,13 ± 4,85	100 ± 7,30 106,63 ± 5,01 108,38 ± 6,79	100 ± 5,95 128,70 ± 7,54 ↑ 126,83 ± 10,03
limbikus területek:			
CA1 piramissejt réteg, hippocampus	100 ± 3,10 116,97 ± 2,61 ↑ 124,08 ± 4,91 ↑	100 ± 3,85 99,68 ± 2,89 95,88 ± 4,63	100 ± 6,60 106,42 ± 5,79 110,73 ± 6,81

CA2 piramissejt réteg, hippocampus	100 ± 7,19 112,46 ± 2,67 113,46 ± 4,19		100 ± 4,39 93,59 ± 4,48 91,43 ± 4,43		100 ± 5,07 99,01 ± 6,15 101,39 ± 7,76
CA3 piramissejt réteg, hippocampus	100 ± 3,57 115,11 ± 3,11 114,55 ± 6,42	↑	100 ± 5,55 96,70 ± 2,93 91,42 ± 3,45		100 ± 5,32 97,21 ± 4,77 106,90 ± 4,67
molecularis réteg, hippocampus	100 ± 6,98 114,62 ± 4,39 122,01 ± 6,79		100 ± 13,95 100,05 ± 8,21 60,66 ± 8,70	↓ ↓	100 ± 4,90 110,85 ± 7,24 108,13 ± 7,80
granularis sejtek rétege, gyrus dentatus	100 ± 3,68 111,75 ± 2,82 115,08 ± 6,12	↑	100 ± 3,56 99,28 ± 3,61 104,17 ± 1,64		100 ± 4,75 100,29 ± 5,77 103,80 ± 9,79
nucleus habenulae medialis	100 ± 7,65 112,61 ± 5,23 96,43 ± 6,12		100 ± 3,02 85,77 ± 5,04 94,51 ± 1,82	↓	100 ± 4,72 108,09 ± 7,52 117,73 ± 5,31
nucleus habenulae lateralis	100 ± 5,82 92,34 ± 3,51 87,58 ± 5,12		100 ± 4,23 97,55 ± 4,58 100,07 ± 6,02		100 ± 8,24 101,12 ± 11,18 100,53 ± 6,72
nucleus amygdaloideus basalis	100 ± 4,31 106,32 ± 3,06 111,54 ± 5,84		100 ± 5,69 93,17 ± 5,60 80,42 ± 4,48	↓	100 ± 5,31 106,65 ± 5,76 101,51 ± 6,63
nucleus interstitialis striae terminalis	100 ± 10,97 123,71 ± 4,45 120,37 ± 3,79		100 ± 9,84 82,86 ± 8,03 92,75 ± 7,01		100 ± 7,48 93,66 ± 9,99 101,56 ± 8,08
nucleus mamillaris medialis	100 ± 5,68 90,31 ± 6,12 109,56 ± 6,67		100 ± 10,61 84,45 ± 10,11 88,72 ± 6,86		100 ± 6,57 97,53 ± 8,14 108,22 ± 6,96
thalamus:					
nucleus anterior ventralis et medialis thalami	100 ± 4,35 104,35 ± 4,07 112,63 ± 2,60	↑	100 ± 5,15 105,85 ± 3,21 108,30 ± 6,33		100 ± 6,89 125,91 ± 6,88 117,29 ± 11,22
nucleus periventricularis thalami	100 ± 6,74 89,12 ± 4,10 99,42 ± 7,42		100 ± 5,24 91,03 ± 4,55 96,09 ± 5,66		100 ± 4,51 99,93 ± 6,92 108,62 ± 6,42
nucleus medialis dorsalis thalami	100 ± 5,28 108,24 ± 4,60 102,87 ± 4,50		100 ± 4,62 94,36 ± 2,90 92,31 ± 5,71		100 ± 3,91 98,75 ± 6,11 103,12 ± 4,84
nucleus reuniens	100 ± 10,52 95,19 ± 1,80 101,36 ± 10,98		100 ± 9,75 114,13 ± 12,47 125,48 ± 6,08		100 ± 12,59 100,39 ± 9,69 98,09 ± 11,62
nucleus ventralis thalami	100 ± 6,23 98,04 ± 2,48 103,58 ± 7,12		100 ± 5,71 100,15 ± 3,13 95,69 ± 2,63		100 ± 6,45 109,50 ± 7,15 107,86 ± 7,59

nucleus reticularis thalami	100 ± 4,76 98,74 ± 4,06 96,02 ± 4,06	100 ± 5,66 104,84 ± 4,41 99,90 ± 3,63	100 ± 5,23 104,44 ± 5,94 111,47 ± 5,67
hypothalamus:			
nucleus suprachiasmaticus	100 ± 23,75 62,65 ± 12,06 116,84 ± 16,32	100 ± 8,44 79,63 ± 8,32 ↑ 91,67 ± 12,39	100 ± 11,92 100,47 ± 12,29 114,51 ± 9,94
nucleus supraopticus	100 ± 9,05 93,73 ± 11,19 96,34 ± 13,76	100 ± 7,68 88,76 ± 8,55 73,90 ± 14,26	100 ± 10,88 80,50 ± 14,39 100,39 ± 20,78
nucleus dorsomedialis hypothalami	100 ± 8,37 110,90 ± 5,71 96,87 ± 9,61	100 ± 8,07 116,11 ± 8,48 101,93 ± 9,77	100 ± 3,07 100,73 ± 8,40 102,83 ± 6,76
nucleus ventromedialis hypothalami	100 ± 7,95 120,12 ± 2,53 119,95 ± 4,20	100 ± 7,48 110,89 ± 5,00 86,29 ± 6,91	100 ± 9,39 123,73 ± 6,93 ↓ 113,70 ± 7,90
nucleus arcuatus	100 ± 19,78 158,04 ± 4,29 154,45 ± 5,21	100 ± 4,73 97,74 ± 5,15 91,51 ± 5,33	100 ± 9,30 119,88 ± 7,20 120,62 ± 7,18
fasciculus medialis prosencephali pars caudalis hypothalami	100 ± 4,60 103,25 ± 5,63 100,66 ± 4,59	100 ± 7,10 102,86 ± 7,84 95,75 ± 4,95	100 ± 7,64 106,03 ± 9,51 112,08 ± 5,98
cerebellum:			
granularis réteg	100 ± 5,04 106,17 ± 8,34 114,10 ± 6,29	100 ± 6,08 98,45 ± 5,80 111,93 ± 5,21	100 ± 6,07 106,67 ± 6,37 109,11 ± 8,55
molecularis réteg	100 ± 7,62 85,99 ± 9,67 87,11 ± 5,84	100 ± 13,16 94,34 ± 15,31 78,17 ± 12,06	100 ± 12,04 108,08 ± 9,50 92,21 ± 10,50
fehérállomány:			
fimbria hippocampi	100 ± 14,10 133,48 ± 14,25 177,46 ± 20,08	100 ± 25,11 123,90 ± 27,28 66,42 ± 22,52	100 ± 21,67 163,30 ± 8,30 113,01 ± 14,82
cerebellaris fehérállomány	100 ± 14,91 112,77 ± 18,92 114,89 ± 29,33	100 ± 16,14 110,06 ± 33,32 99,56 ± 31,39	100 ± 11,27 112,24 ± 32,46 136,04 ± 19,74

A patkányagy különböző síkjaiban metszett, koronasíkjú kriosztát metszeteket hibridizáltunk a CaM I, CaM II és CaM III génekre specifikus antiszensz és szensz [³⁵S]-cRNS próbákkal. A hibridizált metszeteket foszforernyőkre exponáltuk, majd létrehoztuk a metszetek digitális képeit "tároló foszfor"-elven működő képalkotó rendszerrel. Számos kiválasztott agyterület esetében meghatároztuk autoradiográfiás jelölődés értékét dlu/mm² egységben. Az antiszensz próbával hibridizált agyterületek jelölődési értékeit korrigáltuk a foszforernyő-háttérre, a szöveti háttérre, és a

A CaM I mRNS-ek relatív mennyisége számos agyterületen nőtt, így a caudatus-putamen, a gyrus dentatus granuláris sejteinek rétege, a hippocampus CA1 és CA3 piramissejteinek rétege (1. ábra), a cortex piriformis, a cortex temporalis, a cortex occipitalis, a nucleus anterior ventralis et medialis thalami, a nucleus suprachiasmaticus, a nucleus ventromedialis hypothalami, és a nucleus arcuatus területén is (2. ábra). Mindhárom gén adatait figyelembe véve a legkiemelkedőbb növekedést a CaM I mRNS-osztálynál tapasztaltuk, ahol a nucleus arcuatusban a krónikus etanolkezelés 158 %-os, az etanolmegvonás 154 %-os növekedést eredményezett a kontrollhoz viszonyítva.

A CaM II mRNS-ek relatív mennyisége csökkenést mutatott a nucleus habenulae medialis, a hippocampus CA1 és CA2 molecularis rétege, a nucleus amygdaloideus basalis, és a nucleus ventromedialis hypothalami területén (1. táblázat).

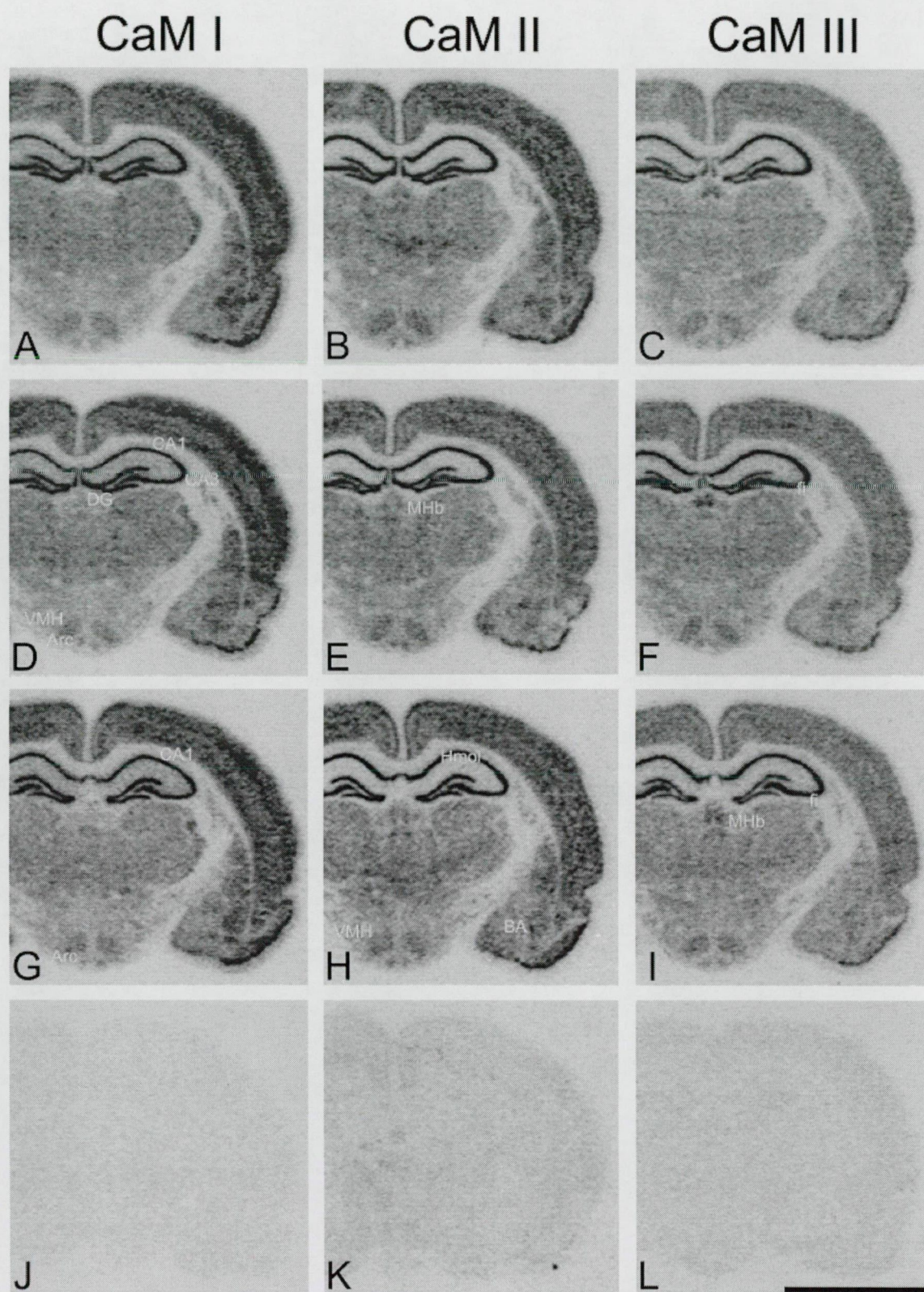
A CaM III mRNS-szint csak néhány agyterületen változott: növekedett a globus pallidus, a nucleus habenulae medialis, és a nucleus anterior ventralis et medialis thalami területén. A fimbria hippocampiban a CaM III mRNS-mennyiség krónikus etanolkezelésre nőtt, míg etanolmegvonásra csökkent (1. táblázat).

Az agypaszta és a membrán standard skálák közti viszony lineáris

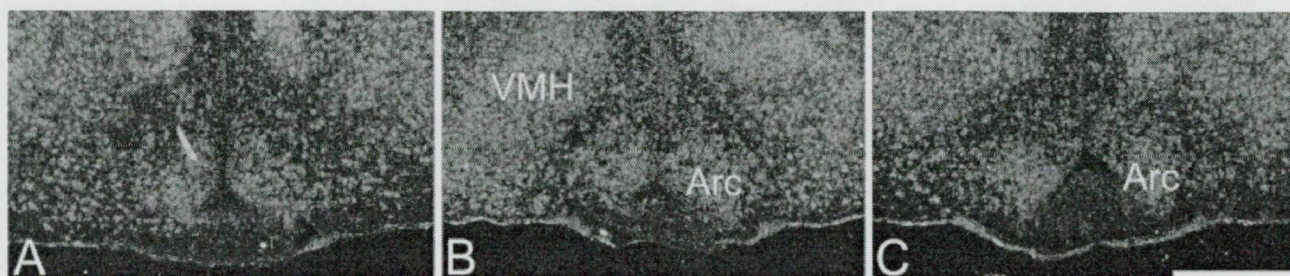
Az agypaszta és a membrán standard skálákat együtt exponáltuk foszforernyőkre, majd a foszforernyő-képeket kvantitáltuk. A jelölődési erősségek értékeit a radioaktivitás függvényében ábrázoltuk (3. ábra). A regressziós analízis az $y_b = a_b x$ egyenletet eredményezte az agypaszta standard skála, és az $y_m = a_m x$ egyenletet a membrán standard skála esetében, ahol x a radioaktivitás (cpm/mm²), y a jelölődési erősség (nettó dlu/mm²), és a_b (= 5872,51), illetve a_m (= 3612,17) az agypaszta, illetve a membrán standard skála

radioaktivitás csökkenésére is. Az eredményül kapott, nettó dlu/mm² egységben kifejezett jelölődési értékeket agyterületenként átlagoltuk. A kísérleti állatok mindhárom csoportja esetében az egyes agyterületek jelölődési értékeinek átlagát a megfelelő agyterület kontroll csoportban mért jelölődési értékei átlagának százalékában fejeztük ki.

A táblázatban agyterületenként felsorolt értékek a CaM I, CaM II és CaM III mRNS-ek relatív területi mennyiségeit mutatják be a kontroll (első sor), az etanolos (második sor), és a megvonásos (harmadik sor) csoportra vonatkozóan. A felfelé, illetve lefelé mutató nyilak szignifikánsan emelkedett, illetve csökkent területi mRNS-szinteket jeleznek a kontroll (az oszlophoz közelebbi helyzet), illetve az etanolos (az oszloptól távolabbi helyzet) csoport megfelelő értékeihez viszonyítva (kétfoldos Student t-teszt; $p < 0,05$; $n = 8-10$). Az egyes fehérállomány-területek esetében tapasztalt nagyobb relatív mRNS-szint változások valószínűleg a szöveti háttérrel alig meghaladó jelölődési értékek viszonylagosan nagyobb szórásainak tulajdoníthatók. (a) bregma -1,4 mm; (b) bregma -3,14 mm.



1. ábra: A krónikus etanolkezelés és -megvonás által a CaM mRNS-osztályok területi mennyiségében előidézett változások patkányagyban. A bregmától -3,14 mm-es távolságban, koronasíkból készített patkányagy-metszeteket hibridizáltuk a CaM I, CaM II és CaM III génekre specifikus antiszensz és szensz [³⁵S]-cRNS próbákkal. Az ábrán a kontroll (A-C), a etanolos (D-F) és a megvonásos (G-I) csoporthoz, valamint a szensz próbákkal hibridizált metszetekhez (J-L) tartozó foszforernyő autoradiogramok láthatók. A sötétebb agyterületekhez erősebb hibridizációs



2. ábra: A krónikus etanolkezelés és -megvonás által a CaM I mRNS-ek mennyiségében előidézett változások a nucleus arcuatusban és a nucleus ventromedialis hypothalamiban. A bregmától -3,14 mm-es távolságban lévő koronális síkban készített patkányagy-metszeteket a CaM I génre specifikus antiszensz [^{35}S]-cRNS próbákkal hibridizáltuk. Az ábrán a kontroll (A), az etanolos (B), és a megvonásos (C) csoporthoz tartozó reprezentatív emulziós autoradiogramok láthatók. A felvételek sötét látótér alkalmazásával készültek, így a világos agyterületekhez erősebb hibridizációs jelölődés tartozik. Az agyterületek jelölése: VMH, nucleus ventromedialis hypothalami; Arc, nucleus arcuatus. Kalibráció: 0,5 mm.

grafikonjának meredeksége. A “tároló foszfor” technológia által biztosított széles lineáris dinamikus tartománynak köszönhetően (Amemiya és Miyahara, 1988) az agyterületeknek megfelelő jelölődési erősség-tartományba eső pontok lineáris regressziós analízise 0,999-nél nagyobb korrelációs koefficiens (r^2) értékeket eredményezett. Az agypaszta és a membrán standard skálák viszonyának ismerete ($a_b/a_m = 1,6258$) szükségeltelenné tette az agypaszta standard skálák használatát a további expozíciók során. Ezen túlmenően, a fenti viszony linearitása biztosította a dlu/mm² értékek egyszerű és pontos konverzióját cpm/mm² értékekké.

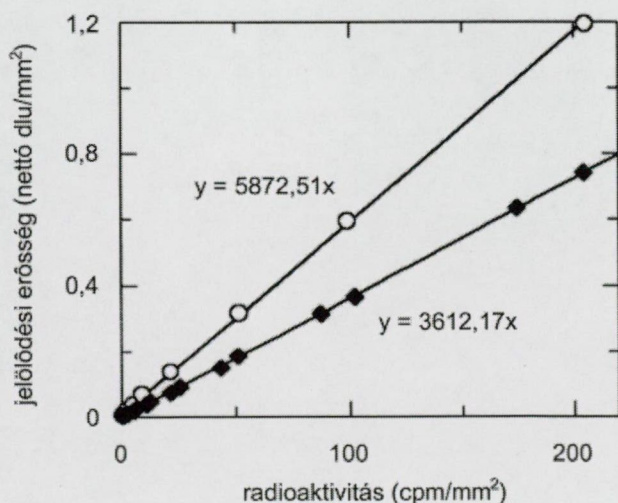
Az agyterületek telítődése; a Hmax érték

Az agyterületek Hmax értékei akkor állapíthatók meg nagyszámú metszetnek nem-telítési koncentrációjú cRNS próbával történő hibridizációja útján, ha előbb meghatározzuk kiválasztott agyterületek Hmax értékeit kevés metszeten végzett telítési hibridizációs kísérletekben. A telítési kísérletekben kvantitálendő agyterületek gondos kiválasztása alapvető jelentőségű. A telítéshez használt cRNS próbamennyiség minimalizálása érdekében olyan agyterületek kiválasztása javasolt, amelyek igen csekély morfológiai változást mutatnak egy ésszerű tartományon belül az agy rosztro-kaudális tengelye mentén.

Jelölődés tartozik. A CaM mRNS-szint szignifikáns változását mutató agyterületek jelölése: CA1 és CA3, a hippocampus CA1 és CA3 piramissejtjeinek rétege; HMol, a hippocampus CA1 és CA2 molecularis rétegei; DG, a gyrus dentatus granularis sejtjeinek rétege; fi, fimbria hippocampi; BA, nucleus amygdaloideus basalis; MHb, nucleus habenulae medialis; VMH, nucleus ventromedialis hypothalami; Arc, nucleus arcuatus. Kalibráció: 5 mm.

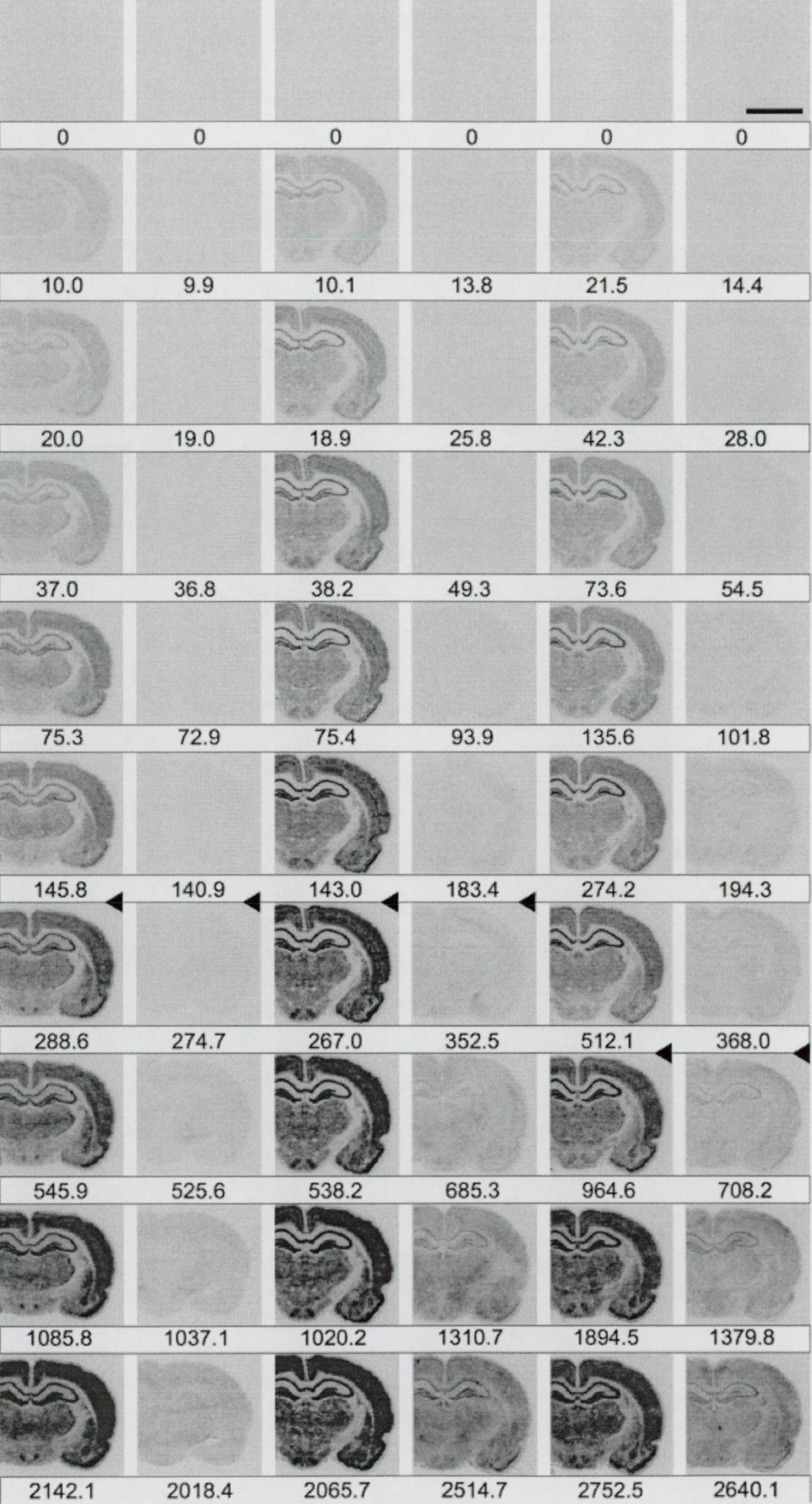
A kiválasztott agyterületekre jellemző hibridizáló cRNS próba értékeknek a lehető legszélesebb tartományt kell átfogniuk (azért, hogy a későbbiekben a Hmax értékek számításának módszerével kvantitálendő agyterületek hibridizáló cRNS próba értékei ebbe a tartományba essenek), és egyenletesen kell eloszlaniuk ezen tartományon belül (azért, hogy elősegítsék az egyenes illesztését).

A fenti feltételeknek megfelelő agyterületeket választottunk ki, és az antiszensz, illetve szensz CaM I, CaM II és CaM III [³⁵S]-cRNS próbák (hozzávetőlegesen felező) sorozathígítását hibridizáltuk a metszetekkel (4. ábra). Mivel a metszetekben megkötődő cRNS próbamennyiségek a metszetekre felvitt cRNS próbamennyiségeknek kevesebb mint 2,5 %-át (sőt, a gyakorlati szempontból reális cRNS próbakonzentrációk esetén kevesebb, mint 1 %-át) tették ki, így a szabad cRNS próbakonzentráció helyett a totál cRNS próbakonzentrációt használtuk a telítési görbék készítésekor (5. ábra). A metszetek digitális képein a kiválasztott agyterületeket körülhatároltuk és megmértük. A szöveti háttérre korrigált hibridizált cRNS próba értékeket a próbakonzentráció függvényében ábrázolva elkészítettük a telítési görbéket (6. ábra A-C). A telítési görbék segítségével meghatároztuk az agyterületek Hmax értékeit. Mivel a különböző CaM cél-mRNS-ek közepes/nagy mennyiségben fordultak elő a patkányagyban, így a telítéshez magas cRNS próbakonzentrációkra volt szükség. Ez a legmagasabb cRNS próbakonzentrációkkal hibridizált metszetek esetében gyakran eredményezett aránytalanul erős és foltos jelölődést, valószínűleg a cRNS próbáknak a metszetekbe való fizikai beletapadása miatt. Így a Hmax értékeknek pusztán a telített metszeteken végzett mérések alapján történő meghatározása torzított eredményekhez vezethetett volna.



3. ábra: A membrán standard skála kalibrációja az agypasza standard skálához. A membrán és a agypasza standard skálákat együtt exponáltuk foszforernyőre szobahőn 24 órán keresztül. A standard skálák digitális képeit dlu/mm² egységekben kvantitáltuk, majd korrigáltuk a foszforernyő-háttérre. Minden adatpont négy független mérés eredményének átlaga. A SEM-et jelző vonalakat az adatpontok jelei takarják. A lineáris regresszió 0,999-nél nagyobb korrelációs koefficiens értékeket (r^2) eredményezett az összes skála esetében. Jelölések: agypasza standard skála (O), membrán standard skála (◆).

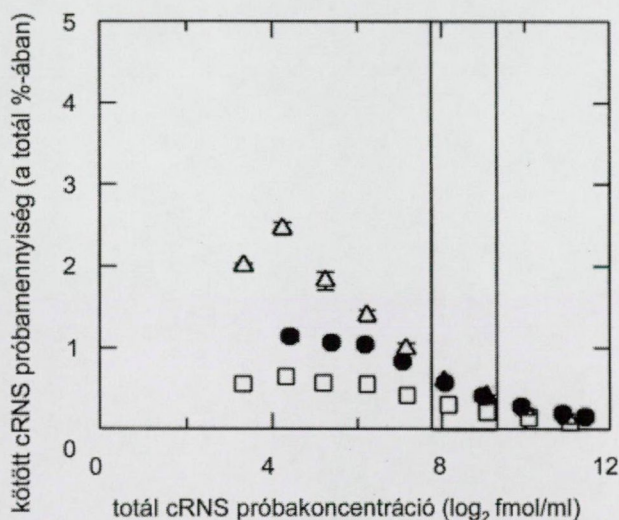
CaM IA CaM IS CaM IIA CaM IIS CaM IIIA CaM IIIS



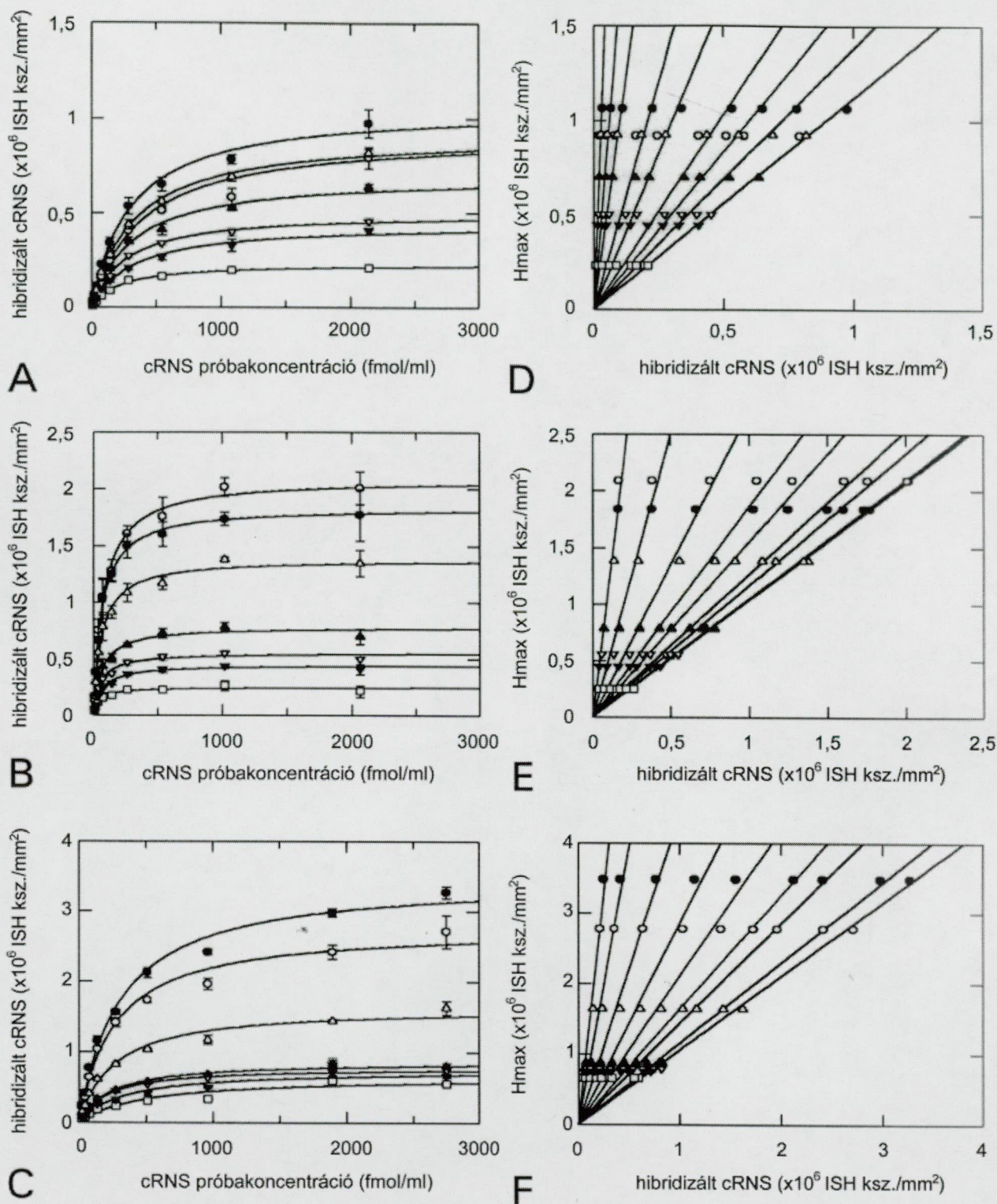
4. ábra: Reprezentatív patkányagy-metszetek képei telítési ISH kísérletekből. Patkányagyból származó sorozatmetszeteket [bregma -3,14-től -3,6-ig; (Paxinos és Watson, 1986)] hibridizáltunk a CaM mRNS-osztályokra specifikus antiszensz és szensz [³⁵S]-cRNS próbák hozzávetőlegesen felező hígítási sorával. A cRNS próbakonzentrációt LSC-vel határoztuk meg és feltüntettük a megfelelő kép alatt fmol/ml egységben. CaM IA: CaM I antiszensz [³⁵S]-cRNS próba; CaM IS: CaM I szensz [³⁵S]-cRNS próba; CaM IIA: CaM II antiszensz [³⁵S]-cRNS próba; CaM IIS: CaM II szensz [³⁵S]-cRNS próba; CaM IIIA: CaM III antiszensz [³⁵S]-cRNS próba; CaM IIIS: CaM III szensz [³⁵S]-cRNS próba. A telítési kísérletek száma, n = 3 mindhárom cRNS próba esetében. A nyílhegyek a 8. ábrán bemutatott nem-telítési ISH kísérletekben alkalmazott cRNS próbakonzentrációk pozícióit jelölik. A kvantitált agyterületeket a 8. ábrán jelöltük meg. Kalibráció: 5 mm.

A telítési adatok átalakítása

Az agyterületek Hmax értékeinek alacsony cRNS próbakoncentrációnál mért hibridizált cRNS próba értékekből történő kiszámításához meg kellett vizsgálni, hogy a különböző agyterületeknek megfelelő telítési görbék Kd értékei különbözőek-e vagy sem. A telítési agyterületek egyikének sem különbözött a Kd értéke a többiétől 0,01-os szignifikancia szinten (kétmintás Student *t*-teszt). 0,05-os szignifikancia szinten is csak egyetlen agyterület, a CaM I cRNS próbával hibridizált laterális habenula-mag (LHb) Kd értékét találtuk különbözőnek három másik, ugyanazon cRNS próbával hibridizált agyterület Kd értékétől (CA1, DG és VPL+VPM; az agyterületek rövidítését lásd a 8. ábra szövegében). Érdekes módon egy megismételt kísérletben egyik Kd érték sem különbözött a többitől 0,05-os szignifikancia szinten. Így azonosnak fogadtuk el a különböző agyterületek Kd értékeit, és



5. ábra: A metszetekhez kötődött CaM I (□), CaM II (Δ) és CaM III (●) [³⁵S]-cRNS próbák mennyiségei az alkalmazott cRNS próbakoncentráció függvényében. A telítési hibridizációs kísérletekben (4. ábra) hibridizált metszetek képeit körülrajzoltuk, és meghatároztuk a metszetek területét (mm² egységben), valamint foszforenyő-háttérre korrigált jelölődését (nettó dlu/mm² egységben). A nettó dlu/mm² értékeket ezután kötött cRNS próba ISH fmol/mm² értékekké konvertáltuk (lásd az *Autoradiográfia, képanalízis, és mikroszkópia* című alfejezetet), majd megszoroztuk a megfelelő metszetterület-értékekkel. A foszforenyők széles lineáris dinamikus tartományának köszönhetően (lásd 3. ábra) az eredményül kapott ISH fmol értékek a metszetekhez kötődött cRNS próbák valós mennyiségeit tükrözték. Ezeket az ISH fmol értékeket a metszetekre felvitt (fmol-ban kifejezett) teljes cRNS próbamennyiség százalékában fejeztük ki, és a totál cRNS próbakoncentráció függvényében ábrázoltuk. Az ISH fmol és a fmol egységek közötti különbség következtében a százalékos értékek valószínűleg alulbecslések (lásd *Az abszolút kvantitálás: a cRNS próba kópiaszám érték és az mRNA mennyiség viszonya* című alfejezetet). A további hibridizációs kísérleteknél alkalmazott közepes cRNS próbakoncentrációk az ábrán a két függőleges vonal által határolt cRNS próbakoncentrációtartományba estek. A SEM-et vonalak jelölik; n = 3 minden adatpont esetében.



6. ábra: A kiválasztott agyterületek telítési görbéi. A sorozatmetszetek digitális képein a kiválasztott agyterületeket (lásd 8. ábra) körülhatároltuk és kvantitáltuk. A szöveti háttérre korrigált hibridizált cRNS próba értékeket a totál cRNS próbakonzentráció függvényében ábrázoltuk (lásd az *Adatfeldolgozás* című alfejezetet). A telítési görbék adatpontokra illesztését és a Hmax értékek meghatározását [jellemzően kevesebb, mint 5 %-os standard hibával (SE)] GraFit 3.0 szoftverrel végeztük. (A) CaM I, (B) CaM II, (C) CaM III. A SEM-et vonalak jelölik; ksz.: kópiaszám; $n = 3$.

A telítési adatok linearizálása. A D, E és F részábrákon rendre az A, B és C részábrákon

az ugyanazon cRNS próbával hibridizált agyterületek Kd értékeinek átlagát K_{av} néven definiáltuk.

A Kd értékek azonosságának fontos következményei vannak: egy adott L próbakoncentráció esetében a Kd értékek helyett K_{av} -ot használva a telítési görbe illesztéséhez használt egyenlet (lásd az *Adatfeldolgozás* című alfejezetet)

$$(1) \quad y = HL / K_{av} + L$$

átrendezhető az $(1, 2, \dots, n)$ agyterületekre a következő módon

$$(2) \quad L/K_{av} + L = y_1/H_1 = y_2/H_2 = \dots = y_n/H_n.$$

Így

$$(3) \quad y_1 / y_2 / \dots / y_n = H_1 / H_2 / \dots / H_n,$$

vagis a különböző agyterületek hibridizált cRNS próba értékeinek arányai megegyeznek a megfelelő Hmax értékek arányaival bármely kiválasztott L cRNS próbakoncentrációnál. Ez hitelesíti Hmax értékek hibridizált cRNS próba értékekből történő számítását.

Ez a számítás egyszerűen elvégezhető, ha az (1) egyenletet a következő lineáris formába rendezzük át:

$$(4) \quad H = (K_{av} + L/L) y,$$

és megszorozzuk a mért hibridizált cRNS próba értéket (y) a lineáris grafikon meredekségével $(K_{av} + L/L)$. Azonban a Hmax értékeket a hibridizált cRNS próba értékek függvényében ábrázoló grafikonnak ezen elméleti úton számított meredekségére épülő számítás kevésbé pontos eredményeket ad (az adatokat nem mutatjuk), mint a kísérleti úton meghatározott Hmax értékeket a hibridizált cRNS próba értékek függvényében ábrázoló grafikon meredekségét felhasználó eljárás. Ilyen grafikonok a telítési kísérletekben használt próbakoncentrációkhoz is készíthetők a Hmax értékeket a telítési kísérletekben mért hibridizált cRNS próba értékek függvényében ábrázolva (6. ábra D-F). Ezeknek a kísérleti adatokra épülő kalibrációs grafikonoknak a meredeksége még alacsony próbakoncentráció esetén is magas marad (7. ábra), ami biztosítja a Hmax értékek pontos számítását közepes/alacsony próbakoncentrációval végzett hibridizációk esetén is.

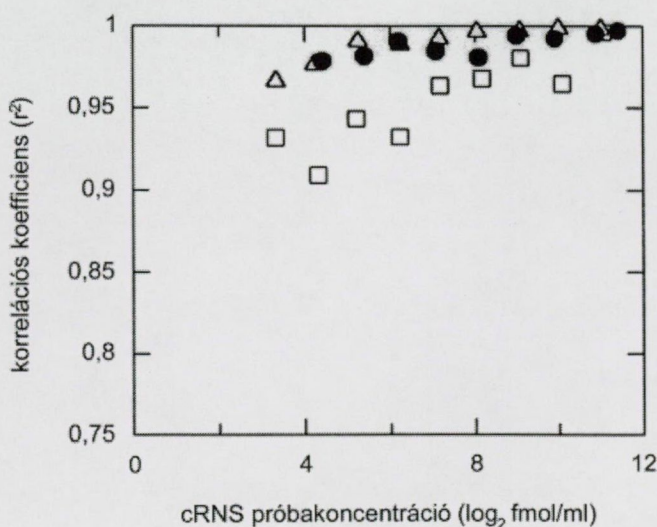
bemutatott adatok láthatók átrendezve. A Hmax értékek egy sorozatát a különböző cRNS próbakoncentrációknál mért hibridizált cRNS próba értékek sorozatainak függvényében ábrázoltuk. A grafikonok mindegyik egyenese egy adott, a telítési kísérletek során használt cRNS próbakoncentrációnak felel meg. Az adatpontok jelölései: CA1 (○), CA3 (●), DG (△), Par (▲), Cg (▼), VPL+VPM (▼), LHb (□); ksz.: kópiaszám; a többi rövidítés magyarázatát lásd a 8. ábra szövegében.

A Hmax értékek számítása nem-telítési cRNS próbakoncentrációnál végzett hibridizációk adataiból

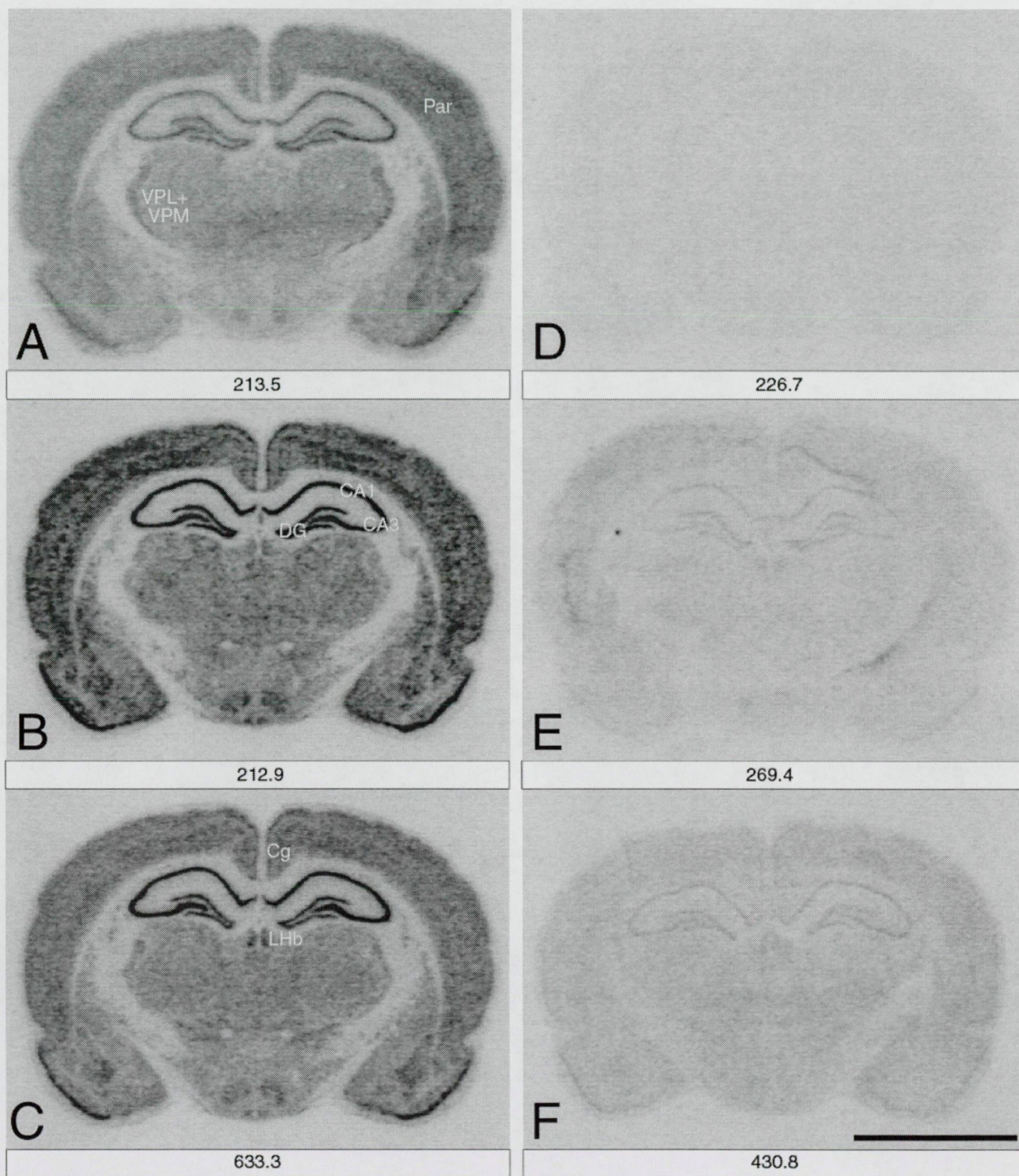
A Hmax értékek számítására szolgáló módszer teszteléséhez hibridizációkat végeztünk a korábbival megegyező síkban metszett koronális patkányagy-metszeteken, de ezúttal csupán egyetlen, alacsonyabb próbakoncentrációt használtunk (8. ábra). A metszetek képein ugyanazokat az agyterületeket határoltuk körül és kvantitáltuk, mint korábban. Az így kapott hibridizált cRNS próba értékek függvényében ábrázolva a telítési kísérletekben korábban meghatározott Hmax értékeket, az alkalmazott cRNS próbakoncentrációnak megfelelő kalibrációs egyeneseket kaptunk (9. ábra A-C). Ezután úgy számítottuk az egyes agyterületek Hmax értékeit, hogy megszoroztuk az agyterület hibridizált cRNS próba értékét a kalibrációs egyenes meredekségével.

Ezen számítási módszer pontosságának ellenőzéséhez külön kalibrációs egyenest készítettünk minden egyes, a telítési kísérletekben kvantitált agyterülethez, mégpedig oly módon, hogy az adott agyterületnek megfelelő adatpontot mindig kihagytuk a kalibrációs egyenes illesztéséből. Az így kapott kalibrációs egyenesek segítségével számított Hmax értékek jól közelítették a telítési kísérletekben meghatározott Hmax értékeket (9. ábra D-F).

A telítési kísérletekben nem kvantitált, további agyterületek Hmax értékei is számíthatók az előzőekben leírt módon, amennyiben hibridizált cRNS próba értékeik a telítési kísérletekben meghatározott tartományba esnek.



7. ábra: A linearizált telítési adatokból levezethető következtetések. A linearizált telítési adatokra illesztett összes egyenes korrelációs koefficiensének (r^2) értékeit ábrázoltuk a cRNS próbakoncentráció függvényében. CaM I (□), CaM II (△) és CaM III (●). Az adatpontok szerint az egyenesek illeszkedésének jósága nem változik jelentősen a cRNS próbakoncentráció függvényében.

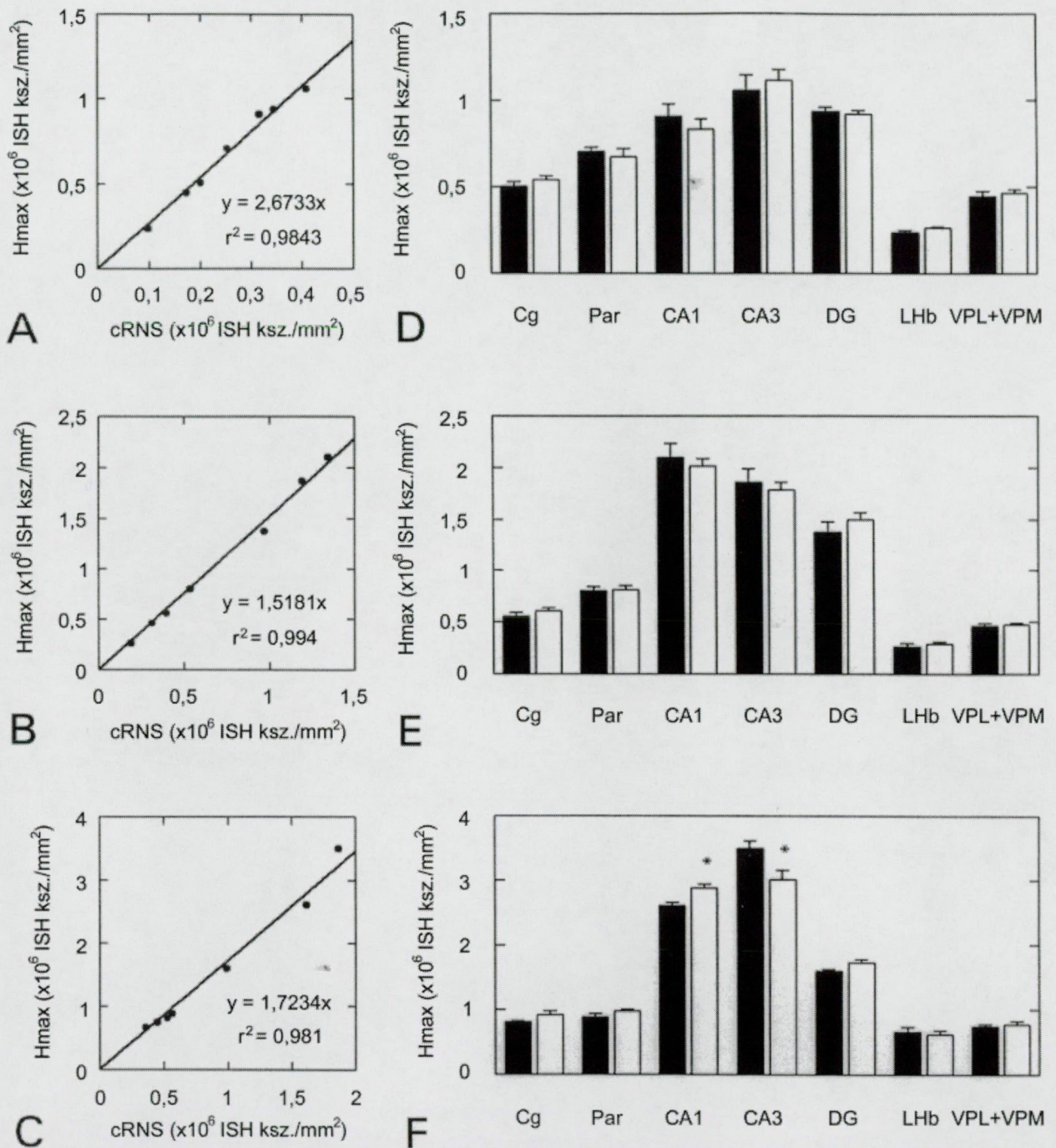


8. ábra: Patkányagy-metszetek reprezentatív képei nem telítési cRNS próbakoncentrációval végzett ISH kísérletekből. Koronasíkból (bregma -3,14 és -3,6 között) metszett patkányagy-metszeteket hibridizáltunk (A) CaM I antiszensz [^{35}S]-cRNS próbával; (B) CaM II antiszensz [^{35}S]-cRNS próbával; (C) CaM III antiszensz [^{35}S]-cRNS próbával; (D) CaM I szensz [^{35}S]-cRNS próbával; (E) CaM II szensz [^{35}S]-cRNS próbával; és (F) CaM III szensz [^{35}S]-cRNS próbával. A cRNS próbakoncentrációt LSC-vel határoztuk meg és fmol/ml egységben tüntettük fel a megfelelő kép alatt. Felhívjuk a figyelmet az alkalmazott [^{35}S]-cRNS próbák specifikus aktivitásainak, valamint nem-telítési

A Hmax értékek számítására szolgáló módszer összefoglalása

1. Kiválasztott szöveti területek Hmax értékeinek meghatározása
 - 1.1. A membrán standard skálák szövet-ekvivalens radioaktivitáshoz történő kalibrációja a kvantitálendő szöveti területek jelölődési értékei által meghatározott tartományon belül (3. ábra)
 - 1.2. A telítési kísérletekhez megfelelő agyterületek kiválasztása és a kiválasztott agyterületeket tartalmazó sorozatmetszetek készítése
 - 1.3. A cél-szekvenciák telítését biztosító (hozzávetőlegesen felező) hígítási sor készítése a cRNS próbából
 - 1.4. A sorozatmetszetek hibridizációja a cRNS próba hígítási sorával
 - 1.5. A hibridizált szöveti metszetek expozíciója autoradiográfiás médiumra (membrán standard skálákkal együtt, ha az autoradiográfiás médium nem biztosítja a radioaktivitás és a jelölődési értékek közötti lineáris viszonyt, mint ahogy az film vagy emulziós autoradiográfia esetén tapasztalható)
 - 1.6. Az autoradiográfiás jelölődések detektálása (4. ábra) és a szöveti területeknek megfelelő telítési görbék készítése a hibridizált cRNS próba értékeknek a cRNS próbakoncentráció függvényében való ábrázolása révén (6. ábra A-C)
 - 1.7. A Hmax értékek meghatározása megfelelő szoftver segítségével
 - 1.8. A telítési adatok linearizálása a Hmax értékeknek a hibridizált cRNS próba értékek függvényében való ábrázolásával
 - 1.9. A Hmax értékek pontos számítását lehetővé tevő cRNS próbakoncentrációtartomány meghatározása az adatpontok egyenesre történő illeszkedése jóságának vizsgálatával (7. ábra).
2. A szöveti régiókhoz tartozó Hmax értékek számítása
 - 2.1. Metszetek készítése ugyanazon szövetből
 - 2.2. A metszetek hibridizálása ugyanazon, közepes koncentrációjú cRNS próbával
 - 2.3. A hibridizált szöveti metszetek és a membrán standard skálák együttes expozíciója autoradiográfiás médiumra

koncentrációinak különbözőségére (lásd a *cRNS próbák* és az *In situ hibridizáció* című alfejezeteket). Cg, cortex cingularis; Par, cortex parietalis; CA1 és CA3, a hippocampus CA1 és CA3 piramisjeiteinek rétege; DG, a gyrus dentatus granularis sejtjeinek rétege; LHb, nucleus habenulae laterális; és VPL+VPM, nucleus ventralis thalami [a bregma értékek megadása és az agyterületek nevének rövidítése (Paxinos és Watson, 1986) alapján történt]. Kalibráció: 5 mm.



9. ábra: Kalibrációs grafikonok nem-telítési CaM I (A), CaM II (B) és CaM III (C) [³⁵S]-cRNS próbakoncentrációval végzett hibridizációkhoz. A kiválasztott agyterületek telítési kísérletekben meghatározott Hmax értékeit ugyanezen agyterületek nem-telítési hibridizációkban mért hibridizált cRNS próba értékei függvényében ábrázoltuk. A Hmax értékek vonatkozásában $n = 3$, míg a hibridizált cRNS próba értékeknél $n = 5$. A grafikonok skálái különbözőek; ksz.: kópiaszám.

A telítési kísérletekben meghatározott régióspecifikus CaM I (D), CaM II (E) és CaM III (F) mRNS-szintek (tömör oszlopok) összehasonlítása az agyterületek nem-telítési hibridizációkban meghatározott hibridizált cRNS próba értékei alapján számított mRNS mennyiségeivel (üres oszlopok). A Hmax értékek becsléséhez külön kalibrációs grafikonot készítettünk minden egyes

- 2.4. Az autoradiográfiás jelölődések detektálása (8. ábra) és a kvantitálendő szöveti területek hibridizált cRNS próba értékeinek meghatározása
- 2.5. Kalibrációs grafikon készítése a Hmax értékeknek az alkalmazott közepes cRNS próbakoncentrációhoz tartozó hibridizált cRNS próba értékek függvényében való ábrázolásával (9. ábra A-C)
- 2.6. A telítési kísérletekben meghatározott tartományba eső hibridizált cRNS próba értékekkel rendelkező szöveti területek Hmax értékeinek számítása a hibridizált cRNS próba értékeknek a kalibrációs egyenes meredekségével való szorzása révén (9. ábra D-F).

agyterülethez, úgy, hogy az egyes kalibrációs egyenesek illesztéséhez nem használtuk fel az adott agyterületnek megfelelő adatpontot. A kétmintás Student t -teszt szerint ($p < 0,05$) a megfelelő cRNS próba ISH kópiaszám/mm² értékek nem különböznek, kivéve a CaM III [³⁵S]-cRNS próbával jelölt CA1 és a CA3 területeket (a hippocampus CA1 és CA3 piramissejteinek rétege; csillagokkal jelölve). Ezek az esetek annak tulajdoníthatók, hogy a 9. ábra C részábráján bemutatott kalibrációs egyenes felső szakaszában ritkán fordulnak elő az adatpontok. A felső két adatpont bármelyikének kihagyása az egyenes illesztéséből jelentős változást okoz a kalibrációs egyenes meredekségében. Ha egy adatpontot sem hagyunk ki a kalibrációs egyenes illesztéséből, akkor a telítéssel meghatározott és a számított Hmax értékek a CA1 és CA3 területek esetében sem különböznek szignifikánsan. A kiválasztott agyterületek elhelyezkedését és nevének rövidítését lásd a 8. ábrán és annak szövegében. A SEM-et vonalak jelölik; a tömör oszlopoknál $n = 3$, az üres oszlopoknál $n = 5$; ksz.: kópiaszám.

MEGBESZÉLÉS

Regionális analízis: az etanolkezelésre és -megvonásra reagáló agyterületek

A krónikus etanolkezelés, valamint az azt követő megvonás által a CaM I, CaM II és CaM III mRNS-ek regionális mennyiségében előidézett szignifikáns változások számos, a fenti kezelésekre érzékeny agyterületet jelöltek ki. A krónikus etanolkezelés, illetve az etanolmegvonás által kijelölt agyterületek különböző, de átfedő halmazokat alkottak az egyes CaM mRNS-osztályokon belül (2. táblázat). A három CaM mRNS-osztály összehasonlításában a krónikus etanolkezelés által kijelölt területek nem átfedő halmazokat alkottak; ugyanez igaz a etanolmegvonás által érintett agyterületekre is. Előfordult viszont két olyan agyterület (a nucleus anterior ventralis et medialis thalami, és a nucleus habenulae medialis), amely az egyik CaM mRNS-osztály esetében a krónikus etanolkezelésre, egy másik CaM mRNS osztály esetében pedig a etanolmegvonásra volt érzékeny (lásd 1. és 2. táblázat).

2. táblázat: A krónikus etanolkezelésre (E), az etanolmegvonásra (M), és mindkét stimulusra (E+ M) a CaM I, CaM II, és CaM III mRNS-szint szignifikáns változásával, illetve azok kombinációjával reagáló agyterületek.

	CaM I	CaM I + II	CaM II	CaM II + III	CaM III	CaM III + I
E	CA3, DG, VMH		MHb		GP, AT	
E + M	Arc, CA1, Oc, Te				fi	
M	AT, CPu, Pir, SCh		BA, VMH, HMol		MHb	

Arc, nucleus arcuatus; AT, nucleus anterior ventralis et medialis thalami; BA, nucleus amygdaloideus basalis, CA1 és CA3, a hippocampus CA1 és CA3 piramissejtjeinek rétege; CPu, caudatus putamen; DG, a gyrus dentatus granularis sejtjeinek rétege, fi, fimbria hippocampi; GP, globus pallidus; HMol, a hippocampus CA1 és CA2 molecularis rétegei; MHb, nucleus habenulae medialis; Oc, cortex occipitalis; Pir, cortex piriformis; SCh, nucleus suprachiasmaticus; Te, cortex temporalis; VMH, nucleus ventromedialis hypothalami.

A kijelölt agyterületek mintázatát a három CaM mRNS-osztály vonatkozásában összehasonlítva szembevetendő az eltérés: a CaM III mRNS-osztály esetében előagy struktúrák, a CaM II mRNS-osztálynál limbikus és hipotalamikusan területek, a CaM I mRNS-osztálynál pedig előagy, limbikus, hipotalamikusan és kortikális régiók voltak elsősorban érintettek.

A kijelölt területek többsége az idegrendszer érző, motoros és limbikus rendszerei valamelyikéhez tartozik, amelyekről korábbi vizsgálatok alapján már ismert, hogy különösen érzékenyek az etanolra (Chandler és mtsai., 1998; Eckardt és mtsai., 1992). Korábbi adatokkal (Eckardt és mtsai., 1992) összhangban a cortex frontalist és a cortex parietalist nem találtuk érintettnek, szemben a szignifikáns változást mutató cortex temporalissal és cortex occipitalissal. A caudatus-putamen korábbi kísérletek szerint érzékeny a krónikus etanolkezelésre és az etanolmegvonásra (Shimizu és mtsai., 1997); ez a terület a globus pallidussal együtt a mi vizsgálatainkban is érintett volt. A limbikus rendszer egyes elemei szintén érzékenynek bizonyultak az alkalmazott kezelésekre [miként egy korábbi vizsgálatban is (Eckardt és mtsai., 1992)]. A limbikus területek közül a nucleus anterior ventralis et medialis thalami, a hippocampus CA1 és CA3 piramissejtjeinek rétegei, a gyrus dentatus granularis sejtjeinek rétege, a nucleus habenulae medialis, és a nucleus amygdaloideus basalis volt érintett. A hipotalamusban a nucleus ventromedialis, a nucleus suprachiasmaticus, és a nucleus arcuatus mutatott szignifikáns választ. Az összes agyterület közül a nucleus arcuatus mutatta a legmarkánsabb változásokat (158 % és 154 % a krónikus etanolkezelés, illetve -megvonás esetében, lásd 1. táblázat).

Összegezve, a szignifikáns CaM mRNS-szint változásokat mutató agyterületek olyan funkcionális agyi rendszereket jelöltek ki, amelyekről korábbi vizsgálatok alapján ismert, hogy közvetlenül érintettek a központi idegrendszernek az az etanolkezelésre adott válaszában (Eckardt és mtsai., 1992).

Funkcionális analízis: a CaM génexpresszió szabályozása

A génspecifikus CaM cRNS próbákkal kontroll patkányagymetszeteken végzett ISH kísérletek szerint a CaM géneket differenciált génexpresszió jellemzi számos agyterületen (Palfi és mtsai., 1999). Több agyi régió dendritgazdag neuropil rétege CaM génenként eltérő erősségű hibridizációs jelölődést mutatott, ami korábbi adatokkal összhangban (Berry és Brown, 1996; Zhang és mtsai., 1993) a CaM mRNS-ek különböző mértékű dendritikus transzlokációjára utal. Mind a CaM gének agyterületenként eltérő mértékű expressziója, mind a CaM mRNS-ek különböző arányú dendritikus transzportja alátámasztja a CaM gének funkcionális különbségére vonatkozó hipotézist (Fischer és mtsai., 1988; Koller és Strehler, 1993).

A krónikus etanolkezelés által előidézett neuronális adaptációs folyamatok során a CaM szabályozása is módosulhat. A CaM többszintű szabályzásának megfelelően a krónikus etanolkezelés hatásának vizsgálata történhet a CaM fehérje aktivitásának szintjén, a CaM fehérje mennyiségének és eloszlásának szintjén, valamint a CaM mRNS-ek mennyiségének és lokalizációjának szintjén is. Valójában a szabályzás egy adott szintjén végzett vizsgálatokból levont következtetések nem feltétlenül érvényesek a szabályzás egy másik szintjén. Ezt a megállapítást alátámasztják azon vizsgálatok, amelyek szerint a CaM aktivitás, a CaM fehérjetartalom és a CaM mRNS-szintek fiziológiai körülmények között sem arányosak egymással számos agyterületen (Caceres és mtsai., 1983; Palfi és mtsai., 1999; Zhou és mtsai., 1985), és eltérő módon változhatnak különböző külső stimulusokra (MacManus és mtsai., 1989; Michelhaugh és mtsai., 1998; Ye és mtsai., 1997).

A krónikus etanolkezelésnek és az azt követő megvonásnak a CaM szabályzására kifejtett hatását már tanulmányozták a CaM fehérje mennyiségi változásainak szintjén, ám a vizsgálatok eredményei meglehetősen különbözőek voltak. Pant és mtsai. mérései szerint a krónikus etanolkezelés számos agyterületen a CaM fehérjetartalom növekedését idézte elő (Pant és mtsai., 1985), míg egy másik munkacsoport szerint az agyterületek CaM fehérjeszintjei nem változtak a krónikus etanolkezelésre (Luthin és Tabakoff, 1984). Lehetséges, hogy ez az ellentmondás az alkalmazott preparálási technikák különbözőségére vezethető vissza, különösen ha tekintetbe vesszük a CaM fehérje Ca^{2+} -indukált gyors disszociációját a plazmamembránról (Deisseroth és mtsai., 1998).

Jelen vizsgálatunkban a krónikus etanolkezelésnek és az etanolmegvonásnak a CaM mRNS-osztályok regionális mennyiségére kifejtett hatását vizsgáltuk patkány központi idegrendszerben (Vizi és mtsai., 2000). Ismert, hogy az etanoltolerancia és -dependencia kialakulásában szerepet játszó különböző neuronális rendszerek adaptív változásokat mutatnak az aktivitás, a fehérje- és az mRNS-tartalom szintjén. Azokat a jelátvivő rendszereket, amelyek saját működésükben kódolják az etanoltoleranciát, "intrinsic" rendszereknek nevezik (Hoffman és mtsai., 1990); ilyenek például a glutamáterg vagy a GABAerg rendszerek. Az "intrinsic" rendszerek az etanol neuronális ingerlékenységet csökkentő hatására a depolarizációt serkentő jelátvivő fehérjék aktivitásának felszabályozásával, illetve a hiperpolarizációt serkentő jelátvivő fehérjék aktivitásának leszabályozásával válaszolnak (Nevo és Hamon, 1995). Az etanolmegvonás megfordítja ezt a szabályozási rendszert, leszabályozva a depolarizációt serkentő, és felszabályozva a hiperpolarizációt serkentő jelátvivő fehérjék aktivitását (Nevo és Hamon, 1995). Ennek megfelelően az "intrinsic" rendszerek normál, etanol-intoxikált és etanolmegvonásos állapotnak megfelelő aktivitásai jellegzetes mintázatot határoznak meg. Megjegyzendő azonban, hogy az "intrinsic" rendszerek jelátvivő fehérjéi alegységeinek esetében a

regionális mennyiségi változások nem szükségszerűen követik a fent említett mintázatot, és ez még inkább igaz a fehérjealegységeket kódoló mRNS-ekre (Chandler és mtsai., 1998).

Azokat a jelátvivő rendszereket, amelyek az etanoltolerancia és -dependencia kialakulását és fenntartását befolyásolják vagy szabályozzák, "extrinsic" rendszereknek nevezik; ilyenek például a noradrenerg és szerotoninerg rendszerek (Hoffman és mtsai., 1990). Az "extrinsic" rendszerek szintén mutatnak adaptációt a krónikus etanolkezelésre, de ezek a változások nem kapcsolódnak olyan közvetlenül az etanol neuronális membránpotenciált módosító hatásához, mint ahogy az az "intrinsic" rendszerek esetében tapasztalható. Ennek megfelelően az "extrinsic" rendszerekre nem jellemzőek a fent említett mintázatok, különösen fehérje- és mRNS-szinten (Nevo és Hamon, 1995). A CaM – mint szabályzófehérje – esetében az várható, hogy az "extrinsic" rendszerekéhez hasonló adaptációs jellemzőkkel rendelkezik. Ezért nem meglepő, hogy vizsgálataink szerint a CaM mRNS-ek regionális szintjeinek változásai nem követik az "intrinsic" rendszerek aktivitásváltozásait leíró mintázatot. Ellenkezőleg, a CaM mRNS-ek regionális mennyiségeinek szignifikáns változásai a CaM mRNS-osztályokon belül ugyanazt az irányt követték a krónikus etanolkezelés és -megvonás esetében is csaknem az összes érintett agyterületen: a CaM I és CaM III mRNS-ek regionális mennyisége nőtt, míg a CaM II mRNS-eké csökkent az érintett agyterületeken (Vizi és mtsai., 2000).

A CaM gének szabályozását illetően vizsgálataink azt mutatták, hogy a CaM gének expressziós szabályozása eltérő a az egyes agyterületeken belül. Ugyanakkor egy-egy CaM gén szabályozása következetesen hasonló volt a különböző agyterületeken.

A korábbi vizsgálatok szerint a CaM I és CaM II gének markáns válaszokkal reagáltak külső stimulusokra (Bai és Weiss, 1991; Barrón és mtsai., 1995; Michelhaugh és mtsai., 1998; Palfi és Gulya, 1999; Solà és mtsai., 1997), amely válaszok időnként reciprok mintázatot mutattak (MacManus és mtsai., 1989). A háztartási jellegű promóterrel rendelkező CaM III gén azonban mérsékelt mRNS-szint változásokat mutatott sejt differenciálódás (Zhang és mtsai., 1993), transzformáció és regeneráció hatására (MacManus és mtsai., 1989), valamint több különböző kísérleti stimulusra (Bai és Weiss, 1991; Michelhaugh és mtsai., 1998; Solà és mtsai., 1997) az adrenalektómia (Gannon és McEwen, 1994) és a dehidráció (Palfi és Gulya, 1999) kivételével. Ezzel szemben a CaM III mRNS-osztályt jellemezte a legjelentősebb mennyiségi növekedés proliferatíván aktivált humán T-sejtekben (Toutenhoofd és mtsai., 1998). A CaM III mRNS-ek mennyisége az embrionális fejlődés alatt is markáns változásokat mutatott (MacManus és mtsai., 1989). Ezen kísérleti adatok jórészt összhangban vannak azzal a hipotézissel, amely szerint a CaM I és CaM II gének – a szabályzó szakaszaikban tapasztalható eltéréseknek megfelelően – eltérően és élénken válaszolnak a különböző külső stimulusokra, míg a CaM III gén expressziója inkább háztartási jellegű (Fischer és mtsai., 1988; Koller és Strehler, 1993). Természetesen a mi

vizsgálatunkra is igaz, hogy mind az agyterületek érintettsége, mind a tapasztalt mRNS-szint változások az alkalmazott kezeléstől függenek, ami megnehezíti az eredmények összehasonlítását és értelmezését. Ennek ellenére az eredményeink több ponton is hasonlóságot mutatnak a leginkább hasonló jellegű vizsgálat következtetéseivel, amelyben a szisztémás kainsav kezelésnek a CaM mRNS-osztályok regionális mennyiségére kifejtett hatását jellemezték egéragyban (Solà és mtsai., 1997). Mindkét vizsgálatban a CaM I mRNS-ek regionális mennyisége növekedést, míg a CaM II mRNS-eké csökkenést mutatott az érintett agyterületeken. A CaM I > CaM II > CaM III sorrend a kainsavas kísérletben a regionális mRNS-szint változások mértékét, a mi vizsgálatunkban pedig a szignifikáns mennyiségi változást mutató agyterületek számát jellemezte. Ezen két vizsgálat eredményeit a CaM génexpresszióra vonatkozó hipotézissel (Fischer és mtsai., 1988; Koller és Strehler, 1993) összevetve megállapíthatjuk, hogy mindkét kísérlet következtetései támogatják azt.

A relatív kvantitálás és a Hmax érték számítására szolgáló módszer

A génexpressziós változások jelentőségének megismerése szükségessé teszi a szövetekben előforduló nukleinsav-szekvenciák egyidejű lokalizálását és mennyiségi meghatározását. E gyakorta előforduló és komoly technikai kihívást jelentő probléma megoldására a legígéretesebb technikának a kvantitatív ISH mutatkozik. Ezen technika módszertanának továbbfejlesztéseként egy egyszerű és gazdaságos eljárást dolgoztunk ki egy heterogén szövet számos területe Hmax értékének nem-telítési cRNS próbakoncentrációnál mért adatokból történő egyidejű számítására (Vizi és Gulya, 2000).

Kvantitatív ISH technika segítségével igazoltuk, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények mellett a különböző szöveti területek Kd értékei szignifikánsan nem különböznek. Ebből levezettük, hogy a vizsgált agyi régiók hibridizált cRNS értékeinek arányai állandóak, azaz a szövet különböző területein az mRNS-ek hozzáférhetősége nem változik a cRNS próbakoncentráció függvényében (feltéve, hogy a hibridizációs idő nem limitáló tényező). Ebből következik, hogy a szöveti területek bármely nem-telítési cRNS próbakoncentrációnál mért hibridizált cRNS értékeinek arányai a megfelelő Hmax értékek valós arányait tükrözik. Ez azt is jelenti, hogy az ISH jelölődési értékek nem-telítési cRNS próbakoncentrációnál mérhető változásai híven tükrözik a Hmax értékek változásait. Ez igazolja a nem-telítési cRNS próbakoncentrációnál mért adatokra épülő relatív kvantitálás jogosságát. A fenti szabályszerűségeket feltételezték, de nem igazolták számos olyan korábbi vizsgálatban, amelyben az mRNS-ek mennyiségbeli változásainak relatív kvantitálása nem-telítési cRNS próbakoncentrációnál meghatározott, majd normalizált

adatokra épült. A különböző sejttípusok permeabilitása közötti jelentős, a pontos relatív kvantitálást veszélyeztető mértékű különbségek további kontroll kísérletekkel tárhatók fel. Ezekben vizsgálható, hogy egy általános nukleinsav próba (például a poliuridin) azonos mértékben jelöli-e az összes sejtet, vagy hogy a különböző területek jelölődésének arányai állandóak-e eltérő fixálási/proteáz-emésztési körülmények esetén is (Angerer és mtsai., 1987).

A farmakológiában a kötési kapacitás pontos meghatározására e célra fejlesztett szoftvereket használnak, nem pedig a dózis-hatás görbék különböző linearizált alakjait (Ross, 1991). Nagy mennyiségű cél-mRNS-ek kvantitálásakor a kvantitatív ISH esetében is előnyösebb lehet egy ilyen szoftver használata a Hmax érték meghatározására, mint a telítési cRNS próbakonzentrációnál végzett mérések, mivel (a) a hibridizált cRNS próba értékek a Hmax elméleti értékét csak végtelen cRNS próbakonzentrációnál érik el, emellett (b) nagyon magas cRNS próbakonzentrációnál a cRNS próbáknak a metszetekbe való fizikai tapadása veszélyezteti a pontos méréseket. Korábbi vizsgálatokban az előzetesen meghatározott Hmax értékeknek alacsonyabb próbakonzentrációnál végzett mérésekből történő számításához kalibrációs egyenesként a telítési görbe egy tetszőlegesen kiválasztott kvázi-lineáris szakaszát alkalmazták (Nunez és mtsai., 1989). Jelen kísérletben igazoltuk, hogy a vizsgált szöveti területek hibridizált cRNS értékeinek arányai állandóak. Ez előfeltétele a Hmax értékek bármely ésszerű cRNS próbakonzentrációnál meghatározott hibridizált cRNS értékekből történő számításának. Ugyankor a hibridizált cRNS értékek arányainak állandósága lehetővé teszi, hogy a Hmax értékek számításához ugyanazt a kalibrációs egyenest használjuk minden szöveti terület esetében. A Hmax értékek számításához mi kísérleti mérésekre épülő, a Hmax értékeket a hibridizált cRNS próba értékek függvényében ábrázoló kalibrációs egyeneseket használtunk, és ezt a módszert sikeresen teszteltük. Közepes koncentrációjú CaM I, CaM II és CaM III [³⁵S]-cRNS próbákkal ISH kísérleteket végeztünk; az ezekből származó hibridizált cRNS próba értékekből számított Hmax értékek jó egyezést mutattak a telítési kísérletekben meghatározott Hmax értékekkel (Vizi és Gulya, 2000). Az ISH kópiaszám/mm² egységben kifejezett Hmax értékek a rágcső agyában már korábban leírt (Palfi és mtsai., 1999; Solà és mtsai., 1996), a CaM génekre jellemző régióspecifikus expressziós mintázatot tükrözték.

Az abszolút kvantitálás: a cRNS próba kópiaszám érték és az mRNS mennyiség viszonya

A cél-mRNS-ek mennyiségének becslésére hibridizációs módszerek – mint a Northern blot vagy az ISH – használatosak. Az *in vivo* mRNS kópiaszám értékeknek ezen hibridizációs módszerekre alapuló becslése számos előzetes feltétel teljesülését feltételezi. (a) A [³⁵S]-UTP α S-el jelölt cRNS próba specifikus aktivitásának kiszámításához azon feltétel teljesülése szükséges, hogy az RNS-polimeráz azonos arányban építse be a radioaktívan jelölt és a jelöletlen nukleotidokat (ez nem igaz a [³⁵S]-UTP α S-el jelölt cRNS próbákra (Angerer és Angerer, 1992), de a különbséget általában elhanyagolják). (b) A hibridizációs jelölődés cpm értékekké való alakítása radioaktív skála segítségével történik. A szövetpaszta standard skála használathoz azon előfeltevésnek kell teljesülnie, hogy egy szövetből és az abból származó pasztából készített metszetek azonos kioltási tulajdonságokkal rendelkezzenek [³⁵S]-re nézve. (c) A cpm értékeknek ISH-val mérhető cRNS próba moláris mennyiségekké alakításához az antiszensz cRNS próba hibridizáló szakaszában a radioaktívan jelölt és a jelöletlen nukleotidok arányának ugyanakkorának kell lennie a hibridizáció előtt és után is, a cRNS próbák összességére nézve. Ez csak akkor teljesülhet, ha a jelölt nukleotidok nem alakulnak át jelöletlenekké a hibridizáció folyamán a jelölésük elvesztése útján, és ha a jelölt és a jelöletlen nukleotidokat azonos valószínűséggel emésztik az RNáz molekulák. A cRNS próbának a cpm érték és a cRNS próba specifikus aktivitása hányadosaként számított moláris mennyiségét nevezzük ISH moláris mennyiségnek, amelyet ISH mol egységekben fejezünk ki. Az ISH moláris mennyiség és az Avogadro szám szorzatával előálló mennyiséget ISH-val detektált cRNS próba kópiaszám értéként (röviden ISH kópiaszám értéként) definiáljuk; mértékegysége az ISH kópiaszám.

A telítési cRNS próbakoncentrációnál mérhető jelölődésből számított ISH-val detektált cRNS próba kópiaszám érték, azaz a Hmax érték elkerülhetetlenül kisebb, mint az *in vivo* kópiaszám érték, ugyanakkor nem értelmezhető az *in vivo* kópiaszám érték valós részhalmazaként. Az *in vivo* jelen lévő cél-szekvenciák két csoportra oszthatók: a hibridizációval nem detektálható cél-mRNS-ekre (ezek a szöveteltávolítás, a fixálás, a beágyazás és az ISH eljárás során vesznek el kimosódás és/vagy lebomlás útján), és a detektálható és nem-detektálható szakaszokat egyaránt tartalmazó cél-mRNS-ekre [a nem-detektálható szakaszok hibridizációját olyan tényezők akadályozhatják, mint a másodlagos nukleinsav-szerkezetek, a térbeli gátlás – például a fixáló keresztkötései -, vagy egyszerűen az adott szakasz lebomlása (Guiot és Rahier, 1995; Jilbert és mtsai., 1986; Lawrence és Singer, 1985)]. Így a cél-mRNS ténylegesen hibridizáló szakaszainak összesített hossza

szükségszerűen kisebb, mint az antiszensz cRNS próba elvileg hibridizáló szakaszának hossza. Ennek ellenére a Hmax érték kiszámításához használt specifikus aktivitás az antiszensz cRNS próba hibridizáló szakaszának hosszára vonatkozik, ami a hibridizáló cél-mRNS kópiaszám értékének alulbecslését eredményezi.

A fent említett előfeltevések és az alulbecslés lehetőségének ellenére az ISH kópiaszám egység használata jelentős előnyökkel jár. Először is, a szöveti háttérre való pontos korrekció csak a cRNS próbák moláris mennyiségeinek szintjén végezhető el. A nettó dlu/mm² egységekben kifejezett, ténylegesen mért adatok vagy az ezekből közvetlenül származtatott cpm/mm² egységben kifejezett adatok szintjén végzett szöveti háttérkorrekció negatív előjelű adatokat eredményezhet a gyenge jelölődést mutató agyterületeknél abban az esetben, ha a szensz cRNS próba specifikus aktivitása magasabb, mint az antiszensz cRNS próbáé. Az ISH kópiaszám egység használatával járó további előny, hogy az ISH által detektált maximális kópiaszám értékek megbízhatóan reprodukálhatóak azonos kísérleti körülmények mellett. Ez azt jelenti, hogy az ISH által detektált maximális kópiaszám érték, a Northern blot által detektált maximális kópiaszám érték, és az *in vivo* jellemző mRNS kópiaszám érték aránya állandó, ami az ISH Northern blot-hoz kalibrálása esetén változatlan kalibrációs grafikont biztosít egy adott cRNS próba / cél-mRNS / ISH protokoll kombináció esetére. A cpm vagy dpm értékek használata az ISH által detektált maximális kópiaszám értékek helyett külön ISH-Northern blot kalibráció készítését tenné szükségessé minden újonnan szintetizált cRNS próbával végzett ISH-hoz (a dpm rövidítés a másodpercenkénti radioaktív bomlások számát jelenti).

Jelen vizsgálatban az ISH kópiaszám értékek területegységre vonatkoznak (egy 15 µm vastag metszet felszínének 1 mm²-es területére). Ez a területegység nem alakítható át egyszerűen térfogati egységgé (mm³) egy térfogati faktorral [jelen esetben (1 mm³/0,15 mm² =) 66,6 mm-el] való megszorzással, mert az így származtatott térfogati egység használata esetén a metszetvastagság megváltoztatásával a Hmax értéke is módosulna (a megváltozott mértékű cél-mRNS vesztés és cRNS próba penetráció miatt).

Az Hmax és az *in vivo* kópiaszám értéke közötti különbség csökkentése érdekében megpróbáltuk minimalizálni a cél-szekvencia-vesztést. Ehhez gyors beágyazást, fagyasztva metszést, formaldehid-fixálást és gyors fixálási, illetve az ISH mosásokat alkalmaztunk [a formaldehid-fixálás biztosítja a legkedvezőbb kompromisszumot a cél-mRNS megtartás és a hozzáférhetőség között (Lawrence és Singer, 1985), a gyors mosások pedig a cél-mRNS kimosódásának mértékét csökkentik]. Ezen erőfeszítések ellenére mindaddig, amíg egy heterogén szövet régióinak Hmax értékei nincsenek közvetlenül kalibrálva pontos és független módszerrel meghatározott régióspecifikus mRNS mennyiségekhez, addig a jelen vizsgálat eredményeihez hasonló adatok csupán a valós mRNS mennyiségekre vonatkozó becsléseknek tekinthetők.

Összefoglalás

Az patkányban működő három CaM gén expressziós szabályozásának jellemzéséhez génspecifikus CaM I, CaM II és CaM III cRNS próbákat készítettünk. Ezek segítségével meghatároztuk a krónikus etanolkezelés és megvonás által a CaM mRNS-ek regionális mennyiségeiben bekövetkező relatív változásokat a patkányagy számos területén. Meghatároztuk a krónikus etanolkezelésre és az etanolmegvonásra a regionális CaM mRNS-szintek változásával reagáló agyterületeket, majd összevetettük őket egy-egy CaM gén, illetve mindhárom CaM gén adatait figyelembe véve. Azonosítottuk a reagáló agyterületek által kijelölt funkcionális agyi rendszereket, amelyek azonosnak bizonyultak az etanol hatására korábban érzékenynek bizonyult rendszerekkel.

A CaM gének szabályozását illetően azt tapasztaltuk, hogy a krónikus etanolkezelés és az etanolmegvonás által kiváltott expressziós válaszok iránya egy kiválasztott CaM gént tekintve szinte minden agyterületen azonos volt. Egy kiválasztott CaM gén expressziós szabályozását vizsgálva az következetesen hasonló volt a különböző agyterületeken: az alkalmazott kezelésekre a CaM I és a CaM III mRNS-ek mennyisége nőtt, a CaM II mRNS-eké pedig csökkent csaknem az összes érintett agyi régióban. A három CaM gén expressziós szabályozása az alkalmazott kísérleti körülmények között különbözőnek bizonyult. Vizsgálatunkban a CaM I és CaM II gének élénkebb és eltérő, ugyanakkor a CaM III gén mérsékelt (a háztartási jellegű fehérjék génjeire jellemző szabályozásnak megfelelő) expressziós válaszát tapasztaltuk. A CaM gének általunk észlelt független szabályozása összhangban van a CaM génexpresszióra vonatkozó hipotézissel. Ezen hipotézis igazolása, illetve a gerincesek genomjában előforduló három CaM gén működésének megismerése azonban csak további vizsgálatok útján lehetséges.

Meghatároztuk a CaM I, CaM II, és CaM III mRNS-re nézve különböző Hmax értékekkel rendelkező vizsgált agyterületek Kd értékeit. A Kd értékek nem különböztek egymástól szignifikánsan a telítéshez elegendő hibridizációs idő alkalmazása esetén. A Kd értékek azonosságából levezettük, hogy a különböző agyterületek hibridizált cRNS próba értékeinek arányai megegyeznek a megfelelő Hmax értékek arányaival bármely kiválasztott cRNS próbakonzentrációnál végzett hibridizáció esetén. Ezek szerint az ISH jelölődési értékek nem-telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásai híven tükrözik a telítési cRNS próbakonzentrációnál mérhető változásokat, ami előfeltétele a Hmax értékek hibridizált cRNS értékekből történő számításának.

Kidolgoztunk és sikeresen teszteltünk egy módszert a különböző agyterületek Hmax értékeinek a telítési jel tényleges megmérése nélküli számítására. A telítési agyterületek Hmax értékeit a nem-telítési cRNS próbakonzentrációnál mért hibridizált cRNS próba

értékek függvényében ábrázoló kalibrációs grafikon segítségével pontosan számíthatók olyan agyterületek Hmax értékei is, amelyekre nézve nem ismert a telítési cRNS próbakoncentrációnál mérhető jelölődés mértéke. Mivel a kvantitálás alapelvei a módszertani határokon túl is érvényesek, a bemutatott eljárás nem csupán különféle nukleinsav próbák, szövetek és detektálási rendszerek alkalmazásával végzett ISH kísérletekben, hanem más szövettani technikák esetén is hasznosnak bizonyulhat.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- Amemiya Y, Miyahara J (1988) Imaging plate illuminates many fields. *Nature* 336: 89-90
- Andressen C, Blümcke I, Celio MR (1993) Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 271: 181-208
- Angerer LM, Angerer RC (1992) In situ hybridization to cellular RNA with radiolabeled RNA probes. Wilkinson DG szerk. *In Situ Hybridization, A Practical Approach*. Oxford, Oxford University Press, 15-32
- Angerer LM, Cox KH, Angerer RC (1987) Demonstration of Tissue-Specific Gene Expression by in Situ Hybridization. Berger SL, Kimmel AR szerk. *Guide to Molecular Cloning Techniques*. San Diego, Academic Press, 649-661
- Bai G, Weiss B (1991) The increase of calmodulin in PC12 cells induced by NGF is caused by differential expression of multiple mRNAs for calmodulin. *J Cell Physiol* 149: 414-421
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15: 303-308
- Barron C (1989) An assay for quantitative nucleic acid hybridization on membrane filters. *Anal Biochem* 182: 280-283
- Barrón S, Tusell JM, Serratos J (1995) Effect of hexachlorocyclohexane isomers on calmodulin mRNA expression in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 30: 279-286
- Berchtold MW, Egli R, Rhyner JA, Hameister H, Strehler EE (1993) Localization of the human bona fide calmodulin genes CALM1, CALM2, and CALM3 to chromosomes 14q24-q31, 2p21.1-p21.3, and 19q13.2-q13.3. *Genomics* 16: 461-465
- Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21: 13-26
- Berry F, Brown IR (1995) Developmental expression of calmodulin mRNA and protein in regions of the postnatal rat brain. *J Neurosci Res* 42: 613-622
- Berry FB, Brown IR (1996) CaM I mRNA is localized to apical dendrites during postnatal development of neurons in the rat brain. *J Neurosci Res* 43: 565-575
- Caceres A, Bender P, Snavely L, Rebhun LI, Steward O (1983) Distribution and subcellular localization of calmodulin in adult and developing brain tissue. *Neuroscience* 10: 449-461
- Cash E, Brahic M (1986) Quantitative in situ hybridization using initial velocity measurements. *Anal Biochem* 157: 236-240
- Chandler LJ, Harris RA, Crews FT (1998) Ethanol tolerance and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 19: 491-495

- Cimino M, Chen JF, Weiss B (1990) Ontogenetic development of calmodulin mRNA in rat brain using in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Dev Brain Res* 54: 43-49
- Conn PM szerk. (1989) *Gene Probes*. San Diego, Academic Press
- Davenport AP, Beresford IJM, Hall MD, Hill RG, Hughes J (1988) Quantitative autoradiography in neuroscience. Van Leeuwen FW, Bujis RM, Pool CW, Pach O szerk. *Molecular Neuroanatomy*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 121-145
- Davis TN, Urdea MS, Masiarz FR, Thorner J (1986) Isolation of the yeast calmodulin gene: calmodulin is an essential protein. *Cell* 47: 423-431
- Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW (1998) Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 392: 198-202
- Diamond I, Gordon AS (1997) Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol Rev* 77: 1-20
- Eberwine JH, Valentino KL, Barchas JD szerk. (1994) *In Situ Hybridization in Neurobiology*. Oxford, Oxford University Press
- Eckardt MJ, Campbell GA, Marietta CA, Majchrowicz E, Rawlings RR, Weight FF (1992) Ethanol dependence and withdrawal selectively alter localized cerebral glucose utilization. *Brain Res* 584: 244-250
- Fischer R, Koller M, Flura M, Mathews S, Strehler PM, Krebs J, Penniston JT, Carafoli E, Strehler EE (1988) Multiple divergent mRNAs code for a single human calmodulin. *J Biol Chem* 263: 17055-17062
- Fulton C, Cheng KL, Lai EY (1986) Two calmodulins in *Naegleria flagellates*: characterization, intracellular segregation, and programmed regulation of mRNA abundance during differentiation. *J Cell Biol* 102: 1671-1678
- Gannon MN, McEwen BS (1994) Distribution and regulation of calmodulin mRNAs in rat brain. *Mol Brain Res* 22: 186-192
- Goldhagen H, Clarke M (1986) Identification of the single gene for calmodulin in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol* 6: 1851-1854
- Guiot Y, Rahier J (1995) The effects of varying key steps in the non-radioactive in situ hybridization protocol: a quantitative study. *Histochem J* 27: 60-68
- Hamoudi WH, Iqbal Z, Sze PY (1995) Acute and chronic actions of ethanol on endogenous calmodulin content in synaptic plasma membranes from rat brain. *Biochem Pharm* 49: 777-784
- Hoffman PL, Ishizawa H, Giri PR, Dave JR, Grant KA, Liu LI, Gulya K, Tabakoff B (1990) The role of arginine vasopressin in alcohol tolerance. *Ann Med* 22: 269-274
- Huang X, Chen S, Tietz EI (1996) Immunocytochemical detection of regional protein changes in rat brain sections using computer-assisted image analysis. *J Histochem Cytochem* 44: 981-987

- Ikeshima H, Yuasa S, Matsuo K, Kawamura K, Hata J, Takano T (1993) Expression of Three Nonallelic Genes Coding Calmodulin Exhibits Similar Localization on the Central Nervous System of Adult Rats. *J Neurosci Res* 36: 111-119
- Jilbert AR, Burrell CJ, Gowans EJ, Rowland R (1986) Histological aspects of in situ hybridization. Detection of poly(A) nucleotide sequences in mouse liver sections as a model system. *Histochemistry* 85: 505-514
- Jonker A, de Boer PA, van den Hoff MJ, Lamers WH, Moorman AF (1997) Towards quantitative in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 45: 413-423
- Joyal JL, Crimmins DL, Thoma RS, Sacks DB (1996) Identification of insulin-stimulated phosphorylation sites on calmodulin. *Biochemistry* 35: 6267-6275
- Kiebler MA, DesGroseillers L (2000) Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* 25: 19-28
- Kink JA, Maley ME, Preston RR, Ling KY, Wallen FM, Saimi Y, Kung C (1990) Mutations in paramecium calmodulin indicate functional differences between the C-terminal and N-terminal lobes in vivo. *Cell* 62: 165-174
- Koller M, Schnyder B, Strehler EE (1990) Structural organization of the human CaMIII calmodulin gene. *Biochim Biophys Acta* 1087: 180-189
- Koller M, Strehler EE (1993) Functional analysis of the promoters of the human CaMIII calmodulin gene and of the intronless gene coding for a calmodulin-like protein. *Biochim Biophys Acta* 1163: 1-9
- Kuhar MJ, Unnerstall JM (1985) Quantitative receptor mapping by autoradiography: some current technical problems. *Trends Neurosci* 8: 49-53
- Lagacé L, Chandra T, Woo SL, Means AR (1983) Identification of multiple species of calmodulin messenger RNA using a full length complementary DNA. *J Biol Chem* 258: 1684-1688
- Lawrence JB, Singer RH (1985) Quantitative analysis of in situ hybridization methods for the detection of actin gene expression. *Nucleic Acids Res* 13: 1777-1799
- Leatherbarrow RJ (1992) GraFit Version 3.0. Staines, Erithacus Software
- Levitan IB (1999) It is calmodulin after all! Mediator of the calcium modulation of multiple ion channels. *Neuron* 22: 645-648
- Lu KP, Rasmussen CD, May GS, Means AR (1992) Cooperative regulation of cell proliferation by calcium and calmodulin in *Aspergillus nidulans*. *Mol Endocrinol* 6: 365-374
- Luthin, G. R. and Tabakoff, B. Effects of ethanol on calmodulin levels in mouse striatum and cerebral cortex. *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 8, 68-72. 1984
- MacManus JP, Gillen MF, Korczak B, Nojima H (1989) Differential calmodulin gene expression in fetal, adult, and neoplastic tissues of rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 278-282

- Martin KC, Casadio A, Zhu H, Rose JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1997) Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 91: 927-938
- Matsuo K, Ikeshima H, Shimoda K, Umezawa A, Hata J, Maejima K, Nojima H, Takano T (1993) Expression of the rat calmodulin gene II in the central nervous system: a 294-base promoter and 68-base leader segment mediates neuron-specific gene expression in transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* 20: 9-20
- Matsuo K, Sato K, Ikeshima H, Shimoda K, Takano T (1992) Four synonymous genes encode calmodulin in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): conservation of the multigene one-protein principle. *Gene* 119: 279-281
- Means AR, Tash JS, Chafouleas JG (1982) Physiological implications of the presence, distribution, and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol Rev* 62: 1-39
- Means AR, VanBerkum MF, Bagchi I, Lu KP, Rasmussen CD (1991) Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol Ther* 50: 255-270
- Meier DA, Pastorek D, James RG, Hager SR (1991) Quantitation of GLUT1 and GLUT4 mRNA using a solution hybridization assay. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 1420-1426
- Michelhaugh SK, Pimputkar G, Gnegy ME (1998) Alterations in calmodulin mRNA expression and calmodulin content in rat brain after repeated, intermittent amphetamine. *Brain Res Mol Brain Res* 62: 35-42
- Morris BJ (1997) Stabilization of dendritic mRNAs by nitric oxide allows localized, activity-dependent enhancement of hippocampal protein synthesis. *Eur J Neurosci* 9: 2334-2339
- Nevo I, Hamon M (1995) Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem Int* 26: 305-336
- Nojima H (1989) Structural Organization of Multiple Rat Calmodulin Genes. *J Mol Biol* 208: 269-282
- Nojima H, Kishi K, Sokabe H (1987) Multiple Calmodulin mRNA Species Are Derived from Two Distinct Genes. *Mol Cell Biol* 7: 1873-1880
- Nojima H, Sokabe H (1987) Structure of a Gene for Rat Calmodulin. *J Mol Biol* 193: 439-445
- Nunez DJ, Davenport AP, Emson PC, Brown MJ (1989) A quantitative 'in-situ' hybridization method using computer-assisted image analysis. Validation and measurement of atrial-natriuretic-factor mRNA in the rat heart. *Biochem J* 263: 121-127
- Oleynikov Y, Singer RH (1998) RNA localization: different zipcodes, same postman? *Trends Cell Biol* 8: 381-383
- Palfi A, Gulya K (1999) Water deprivation upregulates the three calmodulin genes in exclusively the supraoptic nucleus of the rat brain. *Mol Brain Res* 74: 111-116

Palfi A, Hatvani L, Gulya K (1998) A new quantitative film autoradiographic method of quantifying mRNA transcripts for in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 46: 1141-1149

Palfi A, Vizi S, Gulya K (1999) Differential distribution and intracellular targeting of mRNAs corresponding to the three calmodulin genes in rat brain: a quantitative in situ hybridization study. *J Histochem Cytochem* 47: 583-600

Palkovits M (1980) Útmutató és atlasz patkányagy sejtszoportjainak izolált kivételére. Jermy Tibor szerk. *Biológiai tanulmányok*. Budapest, Akadémiai Kiadó

Pant HC, Majchrowicz E, Virmani M (1985) Cerebral alteration in calmodulin levels associated with the induction of physical dependence upon ethanol in rats. *Brain Res* 342: 379-381

Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, Academic Press

Quadroni M, James P, Carafoli E (1994) Isolation of phosphorylated calmodulin from rat liver and identification of the in vivo phosphorylation sites. *J Biol Chem* 269: 16116-16122

Rhyner JA, Ottiger M, Wicki R, Greenwood TM, Strehler EE (1994) Structure of the human CALM1 calmodulin gene and identification of two CALM1-related pseudogenes CALM1P1 and CALM1P2. *Eur J Biochem* 225: 71-82

Rogers MS, Strehler EE (1996) Calmodulin. Celio MR szerk. *Guidebook to the Calcium-Binding Proteins*. Oxford, Oxford University Press, 34-40

Ross EM (1991) *Pharmacodynamics: Mechanisms of Drug Action and the Relationship Between Drug Concentration and Effect*. Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P szerk. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Singapore, Pergamon Press, 43-48

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T szerk. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schenborn ET, Mierendorf RCJ (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res* 13: 6223-6236

Sherman TG, McKelvy JF, Watson SJ (1986) Vasopressin mRNA regulation in individual hypothalamic nuclei: a northern and in situ hybridization analysis. *J Neurosci* 6: 1685-1694

Shimizu Y, Akiyama K, Kodama M, Ishihara T, Hamamura T, Kuroda S (1997) Alterations of calmodulin and its mRNA in rat brain after acute and chronic administration of methamphetamine. *Brain Res* 765: 247-258

Shimoda K, Ikeshima H, Matsuo K, Hata J, Maejima K, Takano T (1995) Spatial and temporal regulation of the rat calmodulin gene III directed by a 877-base promoter and 103-base leader segment in the mature and embryonal central nervous system of transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* 31: 61-70

Smith VL, Doyle KE, Maune JF, Munjaal RP, Beckingham K (1987) Structure and

sequence of the *Drosophila melanogaster* calmodulin gene. *J Mol Biol* 196: 471-485

Solà C, Tussel JM, Serratosa J (1996) Comparative study of the pattern of expression of calmodulin messenger RNAs in the mouse brain. *Neuroscience* 75: 245-256

Solà C, Tussel JM, Serratosa J (1997) Differential response of calmodulin genes in the mouse brain after systemic kainate administration. *Neuroscience* 78: 155-164

Toutenhoofd SL, Foletti D, Wicki R, Rhyner JA, Garcia F, Tolon R, Strehler EE (1998) Characterization of the human CALM2 calmodulin gene and comparison of the transcriptional activity of CALM1, CALM2 and CALM3. *Cell Calcium* 23: 323-338

Tschudi C, Ullu E (1988) Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes. *EMBO J* 7: 455-463

Vizi S, Gulya K (2000) Calculation of maximal hybridization capacity (Hmax) for quantitative in situ hybridization: a case study for multiple calmodulin mRNAs. *J Histochem Cytochem* 48: 893-904

Vizi S, Palfi A, Gulya K (2000) Multiple calmodulin genes exhibit systematically different responses chronic ethanol treatment and withdrawal in several regions of the rat brain. *Mol Brain Res*, accepted.

Wicht H, Maronde E, Olcese J, Korf HW (1999) A semiquantitative image-analytical method for the recording of dose-response curves in immunocytochemical preparations. *J Histochem Cytochem* 47: 411-420

Yap KL, Ames JB, Swindells MB, Ikura M (1999) Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins* 37: 499-507

Ye Q, Wei Y, Fischer R, Borner C, Berchtold MW (1997) Expression of calmodulin and calmodulin binding proteins in rat fibroblasts stably transfected with protein kinase C and oncogenes. *Biochim Biophys Acta* 1359: 89-96

Zhang J, Madden TL (1997) PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* 7: 649-656

Zhang SP, Natsukari N, Bai G, Nichols RA, Weiss B (1993) Localization of the multiple calmodulin messenger RNAs in differentiated PC12 cells. *Neuroscience* 55: 571-582

Zhou LW, Moyer JA, Muth EA, Clark B, Palkovits M, Weiss B (1985) Regional distribution of calmodulin activity in rat brain. *J Neurochem* 44: 1657-1662

A PhD ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÁSA

Az eukarióta élőlényekre általánosan jellemző sejtszintű kommunikációs forma a Ca^{2+} -jelátvitel. A Ca^{2+} -jelek lokális módosításában és a fehérjeszintű kölcsönhatások szintjére történő átvitelében (mediálásában) a Ca^{2+} -kötő fehérjék játszik az elsődleges szerepet. Ezek közé tartozik az intracelluláris Ca^{2+} -jelek fő mediátora, a kalmódulin (CaM) is. A CaM valamennyi eukarióta sejtben megtalálható, és olyan alapvető folyamatok irányításában vesz részt, mint a sejtosztódás, a motilitás, a szekréció, továbbá az ioncsatornák és a génexpresszió szabályozása. Különösen fontos feladatot lát el a CaM az ún. ingerlékeny sejtekben. A idegsejtekben megnyilvánuló CaM aktivitás szabályozásának feltárása a CaM-al kapcsolatos kutatások egyik fő célja. A CaM-aktivitás szabályozása több szinten valósul meg: (a) a CaM hírvivő RNS-ek (mRNS-ek) szintézisének, érésének, lokalizációjának és lebontásának szintjén, (b) a CaM fehérje szintézisének, transzportjának és lebontásának szintjén, valamint (c) a CaM fehérje poszttranszlációs módosításának szintjén. A gerinceseknél az egyedüli CaM fehérjét három működő CaM gén kódolja (CaM I, CaM II, és CaM III). A három, látszólag redundáns CaM gén fennmaradását a gerinces evolúció folyamán jól magyarázza az a feltevés, hogy az egyes CaM gének funkciója különböző. Ezt a hipotézist megerősítik azok a kísérleti adatok, amelyek szerint a CaM gének mind transzkriptumaik intracelluláris lokalizációját, mind cisz-szabályzó régióik felépítését, mind expressziós szabályozásukat tekintve különböznek egymástól. Az egyes CaM gének szerepének megértését az gátolja, hogy nem vagy kevésbé ismert(ek) (a) az egyes CaM gének expressziójának szabályozásáért felelős molekuláris mechanizmusok, (b) az egyes CaM gének expressziós változásai különböző körülmények között, és (c) az egyes CaM-mRNS osztályok mennyiségbeli arányai megváltozásának jelentősége.

Az mRNS molekulák kvantitálásához kis mennyiségű szöveti minta esetén is jól használható az *in situ* hibridizáció (ISH). A relatív kvantitálás céljából végzett ISH kísérletekben általános a nem-telítési komplementer RNS (cRNS) próbakoncentráció használata. Ugyanakkor a hibridizációs jelölődési értékek nem-telítési cRNS próbakoncentrációnál mérhető változásairól nem igazolt, hogy szövetben végzett hibridizációk esetén is híven tükrözik a telítési cRNS próbakoncentrációnál mérhető változásokat. A heterogén szövetek egyes régióira jellemző maximális hibridizációs kapacitás értékeknek (H_{max} -oknak, vagyis az mRNS-tartalmakra vonatkozó becsléseknek) a nem-telítési cRNS próbakoncentrációnál mérhető hibridizációs jelölődésekből történő pontos és egyidejű számítását a megfelelő módszer hiánya akadályozza.

A kísérletekhez hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. A módszertani kísérletekben alkalmazott állatok súlya 260 ± 10 g volt. A krónikus etanolkezeléshez az

állatokat három, egyenként öt állatból álló csoportra osztottuk. Az etanolos és a megvonásos csoport három hétig csak 5,0 % etanolt tartalmazó folyékony tápot fogyaszthatott, míg a kontroll csoport ezalatt izokalorikus kontroll folyadéktápot kapott. A megvonásos csoport etanolos tápját az állatok feláldozása előtt 12 órával kontroll tápra cseréltük. Az állatok átlagos súlya 224 ± 13 g-ról 293 ± 23 g-ra nőtt. Az állatokat dekapitáltuk, majd agyakat beágyasztuk és koronasíku kriosztát metszeteket készítettünk belőlük. A CaM I, CaM II és CaM III mRNS-ek 3'-nemkódoló régiói egy-egy szakaszának megfelelő genomikus szekvenciákat polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk, majd klónoztuk. A megfelelően linearizált vektorokat templátként használva antiszensz és a szensz CaM [^{35}S]-cRNS próbákat szintetizáltunk *in vitro* transzkripcióval. A CaM cRNS próbákat ISH kísérletekben hibridizáltuk a koronális patkányagy-metszetekkel. A hibridizált patkányagy-metszeteket radioaktív standard skálákkal együtt foszforernyőkre exponáltuk. Az autoradiogramokon kvantitatív képanalízist végeztünk. A krónikus etanolkezeléssel kapcsolatos kísérletben az egyes agyterületek jelölődési értékeinek átlagát a megfelelő agyterület kontroll csoportban mért jelölődési értékei átlagának százalékában fejeztük ki ($n = 8-10$). A módszertani vizsgálatnál az agyterületek jelölődésének mértékét cRNS próba ISH kópiaszám/mm² egységben fejeztük ki, és ezeket az értékeket az agyterületek cél-mRNS kópiaszám/mm² értékeire vonatkozó becsléseknek tekintettük (a telítési, illetve nem-telítési cRNS próbakoncentrációt alkalmazó kísérletekben $n = 3$, illetve 5). A statisztikai analízist kétmintás Student *t*-teszttel végeztük. Egy adott agyterület kontroll, etanolos és megvonásos csoportban mért relatív mRNS-szint értékeit, illetve egy agyterület telítéssel és számítással meghatározott mRNS-szint értékeit akkor tekintettük szignifikánsan különbözőnek, ha a *p* értéke kisebb volt, mint 0,05.

Kísérleteink eredményeit az alábbiakban foglaljuk össze.

1. A CaM I, CaM II, és CaM III géneknek megfelelő mRNS-osztályokra specifikus cRNS próbákat készítettünk.
2. A kontroll, a krónikus etanolkezelést kapott, és az etanolmegvonásban részesült kísérleti csoportoknál a patkányagy 36 területén határoztuk meg a CaM I, a CaM II, és a CaM III mRNS-eknek a megfelelő kontroll értékekre normalizált regionális mennyiségeit. A legmarkánsabb expressziós változások mértéke meghaladta az 50%-ot (a CaM I mRNS-szint a nucleus arcuatusban 158 % és 154 % volt a kontrollhoz viszonyítva a krónikus etanolkezelés, illetve -megvonás esetében). A krónikus etanolkezelés és az etanolmegvonás által kiváltott expressziós válaszok iránya egy kiválasztott CaM gént tekintve szinte minden agyterületen azonos volt. Egy kiválasztott CaM gén expressziós szabályozását vizsgálva az következetesen hasonlóan találtuk a különböző agyterületeken: az alkalmazott kezelésekre a CaM I és a CaM III mRNS-ek mennyisége nőtt, a CaM II mRNS-eké pedig csökkent csaknem az összes érintett agyi régióban. A három CaM

gén expressziós szabályozása az alkalmazott kísérleti körülmények között különbözőnek bizonyult. Vizsgálatunkban a CaM I és CaM II gének élénkebb és eltérő, ugyanakkor a CaM III gén mérsékelt (a háztartási jellegű fehérjék génjeire jellemző szabályozásnak megfelelő) expressziós válaszát tapasztaltuk. A CaM gének általunk észlelt független szabályozása összhangban van a CaM génexpresszióra vonatkozó, korábban említett hipotézissel.

3. Meghatároztuk a krónikus etanolkezelésre, illetve az etanolmegvonásra a CaM mRNS-ek regionális mennyiségének szignifikáns változásával reagáló agyterületeket. Ezek egy kiválasztott CaM gént vizsgálva részben átfedő halmazokat alkottak, a különböző CaM gének adatait összevetve pedig szinte teljesen különbözőek voltak. Azonosítottuk az érintett agyterületek által kijelölt funkcionális idegi rendszereket. Ezek az idegrendszer érző, motoros és limbikus rendszerei voltak, amelyek az etanol hatására más kísérletekben is érzékenyek bizonyultak.

4. Meghatároztuk a CaM I, CaM II, és CaM III mRNS-re nézve különböző Hmax értékekkel rendelkező vizsgált agyterületek Kd értékeit. A Kd értékek nem különböztek egymástól szignifikánsan a telítéshez elegendő hibridizációs idő alkalmazása esetén.

5. A Kd értékeket azonosnak elfogadva levezettük, hogy a különböző agyterületek hibridizált cRNS próba értékeinek arányai megegyeznek a megfelelő Hmax értékek arányaival bármely kiválasztott cRNS próbakoncentrációnál végzett hibridizáció esetén. Ezek szerint az ISH jelölődési értékek nem-telítési cRNS próbakoncentrációnál mérhető változásai híven tükrözik a telítési cRNS próbakoncentrációnál mérhető változásokat. Ez igazolja a relatív kvantifikálás céljából végzett ISH kísérletek jogosságát, és előfeltétele a Hmax értékek hibridizált cRNS értékekből történő számításának.

6. Kidolgoztunk és sikeresen teszteltünk egy módszert a különböző agyterületek Hmax értékeinek a telítési jel tényleges megmérése nélküli számítására. A telítési agyterületek Hmax értékeit a nem-telítési cRNS próbakoncentrációnál mért hibridizált cRNS próba értékek függvényében ábrázoló kalibrációs grafikon segítségével pontosan számíthatók voltak az agyterületek Hmax értékei.

Vizsgálataink eredményei egyrészt felhasználhatók az etanol idegrendszeri hatásainak feltárására irányuló kutatások során, másrészt a gerinces CaM génexpresszió szabályozását leíró elmélet kialakításához. A módszertani kísérleteink során kidolgozott eljárás nem csupán különféle nukleinsav próbák, szövetek és detektálási rendszerek alkalmazásával végzett ISH kísérletekben bizonyulhat hasznosnak, hanem más szövettani technikák esetében is.

SUMMARY OF PhD THESIS

All eukaryotic organisms employ calcium (Ca^{2+}) signaling for cellular communication. The local modification and mediation of Ca^{2+} -signals is largely achieved by means of Ca^{2+} -binding proteins. One of these is calmodulin (CaM), the major mediator of intracellular Ca^{2+} -signals. CaM is present in all eukaryotic cells and governs a number of basic cellular processes such as cell division, motility, secretion, and regulation of ion channels and gene expression. CaM plays an especially important role in excitable cells. Revealing of the regulation of neuronal CaM activity is one of the major aims of research focused on CaM. CaM activity is regulated at several levels: (a) at the levels of the synthesis, maturation, localization, and degradation of CaM messenger RNAs (mRNAs), (b) at the levels of synthesis, transport, and degradation of the CaM protein, and (c) at the level of posttranslational modification of the CaM protein. The only CaM protein is encoded by three CaM genes (CaM I, CaM II, and CaM III) in vertebrates. The maintenance of the three, seemingly redundant CaM genes through the vertebrate evolution is explained by a hypothesis, which assigns different functions to each CaM gene. This hypothesis is supported by experimental data suggesting that the CaM genes are different with respect to the intracellular localization of their transcripts, the organization of their cis-regulating regions, and the regulation of their expression. Understanding of roles of the three CaM genes is hindered by the fact, that (a) the molecular mechanisms responsible for the regulation of CaM gene expression, (b) the changes in the expression of CaM genes under various circumstances, and (c) the importance of the changes in the ratio of CaM I, II, and III mRNA quantities are not completely known.

Quantification of mRNAs can be performed with *in situ* hybridization (ISH), even when the availability of the tissue is limited. ISH experiments used for relative quantification are often performed at non-saturating complementary RNA (cRNA) probe concentration. However, the changes in hybridization labeling values measured at non-saturating cRNA probe concentration have not been proved to reflect fairly the changes in labeling values measured at saturating cRNA probe concentration, for hybridizations in tissues. Maximal hybridization capacity (H_{max}) values can be assigned to the regions of tissues with a heterogeneous structure, and are considered as estimations of corresponding mRNA contents. Accurate and simultaneous calculation of H_{max} values from hybridization labeling values measured at non-saturating cRNA probe concentration is hindered by the lack of the proper method.

Male Sprague-Dawley rats were used in the experiments. In the methodological study, the weight of the animals was 260 ± 10 g. For chronic ethanol treatment, animals were

divided into three groups of five rats. The chronic ethanol treated and the withdrawal group were fed with a liquid diet containing 5.0 % ethanol for three weeks. The control group received a control isocaloric diet for the same time period. The ethanol containing diet of the withdrawal group was replaced with control diet 12 hours before sacrificing the animals. The mean weight of the animals increased from 224 ± 13 g to 293 ± 23 g. Animals were decapitated, the brains embedded, and coronal cryostat sections were cut. Genomic sequences corresponding to segments of the 3' non-coding regions of CaM I, CaM II, and CaM III mRNAs were amplified by polymerase chain reaction, and cloned. Antisense and sense CaM [^{35}S]-cRNA probes were synthesised by *in vitro* transcription, employing the properly linearized vectors as templates. The CaM cRNA probes were hybridized with coronal rat brain sections in ISH experiments. The hybridized rat brain sections were exposed to phosphor screens together with radioactive standard scales. Quantitative image analysis was performed on the autoradiogramms. In experiments examining the effects of chronic ethanol treatment and -withdrawal, the mean of the labeling values of brain areas were expressed as the percent of the mean of labeling values of the corresponding brain areas measured in the control group ($n = 8-10$). In the methodological study, the labeling values of brain areas were expressed in cRNA probe ISH copy number/ mm^2 unit. These values were considered as estimations of the target mRNA copy number/ mm^2 values of the brain areas (in experiments employing saturating, and non-saturating cRNA probe concentrations, $n = 3$ and 5 , respectively). Statistical analysis was performed with Student's *t* test. Relative mRNA level values of a brain area corresponding to the control, chronic ethanol treated and withdrawal groups, or mRNA level values of a brain area determined by saturation and calculation were considered significantly different when *p* was less than 0,05.

Our experimental results are summarised as follows.

1. We prepared cRNA probes specific to the mRNA classes corresponding to CaM I, CaM II, and CaM III genes.
2. Regional quantities of the CaM I, CaM II, and CaM III mRNAs normalized to the corresponding control values were determined in 36 areas of the rat brain in the control, chronic ethanol treated, and withdrawal group. Most remarkable changes in gene expression exceeded 50 % (the CaM I mRNA level in the nucleus arcuatus was 158 % in the chronic ethanol treated, and 154 % in the withdrawal group, compared to the control). Directions of the changes in expression of a chosen CaM gene induced by chronic ethanol treatment and withdrawal were the same in almost every brain areas. Regulation of the gene expression of a chosen CaM gene was similar in different brain regions: the abundances of CaM I and CaM III mRNAs increased, while the quantities of CaM II mRNA decreased to the experimental treatments in almost every brain regions. Regulation of the

three CaM genes was different under the experimental conditions employed. CaM I and CaM II genes exhibited vivid and differential changes in their expression, while CaM III gene displayed moderate alterations (characteristic to the genes of housekeeping proteins). We observed the independent regulation of CaM genes, which is in accordance with the above mentioned hypothesis on CaM gene expression.

3. Brain areas reacting to chronic ethanol treatment or withdrawal with significant changes in regional abundances of CaM mRNAs were identified. These areas were partly the same with respect to a chosen CaM gene, and completely different in reference to the three CaM genes. Functional neural systems highlighted by the responsive brain areas were identified as the sensory, motor, and limbic systems of the brain. These neural systems have been shown to be sensitive to the action of ethanol in previous studies.

4. Kd values of brain areas characterised by different Hmax values for CaM I, CaM II, and CaM III mRNAs were determined. The Kd values did not differ significantly when the hybridization time was sufficient for saturation.

5. We accepted that the Kd values are identical, and deduced the conclusion that the ratios of hybridized cRNS probe values of different brain areas and the ratios of corresponding Hmax values are the same, for hybridizations performed at any given probe concentration. Thus the changes in ISH labeling values measured at non-saturating cRNA probe concentration reflect fairly the changes measured at saturating cRNA probe concentration. This justifies both the use of the ISH technique for relative quantification, and the calculation of Hmax values from hybridized cRNA values.

6. A method for the calculation of Hmax values of brain areas was developed and successfully tested. By means of a calibration graph displaying Hmax values of brain areas as a function of hybridized cRNA values measured at non-saturating cRNA probe concentration, Hmax values were calculated accurately for several brain areas.

Our results help to elucidate the neural effects of ethanol, and to develop the theory of regulation of vertebrate CaM gene expression. The procedure we developed in our methodological study can be of use not only in ISH experiments with the application of a variety of nucleic acid probes, tissues, and detection systems, but in other histological techniques as well.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Szüleimnek és Nővéremnek mindazt a szeretetet és támogatást, amellyel segítettek tanulmányaim és munkám éveit során.

Köszönöm Dr. Siklós Lászlónak, a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központja Biofizikai Intézete főmunkatársának, volt szakvezetőmnek, hogy az Intézet Molekuláris Neurobiológiai Csoportjában szakmai irányításával megismerkedhettem az idegtudományi kutatások alapjaival.

Köszönöm Dr. Gulya Károlynak, a Szegedi Tudományegyetem Állattani és Sejtbiológiai Tanszéke vezetőjének, témavezetőmnek, hogy lehetővé tette, hogy a Tanszéken dolgozva végezhessem a Neurobiológia PhD alprogram keretében posztgraduális tanulmányaimat. Köszönöm, hogy a Tanszék Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumában biztosította számomra a kutatás feltételeit, és munkámat szakmailag irányította.

Köszönöm az értekezéshez felhasznált közlemények társszerzőinek munkáját. Köszönöm Dr. Pálfi Árpádnak, egyetemi adjunktusnak az összehasonlító és a módszertani tanulmányban nyújtott nélkülözhetetlen közreműködését.

Köszönöm Dr. Hatvani Lászlónak, a Szegedi Tudományegyetem Bolyai Intézete tanszékvezető egyetemi tanárának, akademikusnak, a módszertani tanulmánnyal kapcsolatos hasznos konzultációkat.

Köszönöm egykori és mai munkatársaimnak, Dr. Fekete Éva és Dr. Halasy Katalin egyetemi docenseknek, valamint Bagyánszki Mária, Bakota Lídia, Baranyai József, Boros András, és Körtvély Előd egyetemi tanársegédnek a mindennapi élet során nyújtott segítségét.

Köszönöm Ambrus Józsefné szakasszisztensnek a kísérleti munka során tanúsított fáradhatatlan munkáját. Köszönöm Győrfiné Kosztka Mária és Gera Istvánné asszisztensek, valamint Kiss Györgyné, Hovanyecz Andrea, Dudás Szilvia és Némethné Szabó Zsuzsanna tanszéki adminisztrátorok hasznos közreműködését.

Köszönöm Dr. Hiripi Lászlónak, Dr. Aradi Attilának, Dr. Farkas Tamásnak és Dr. Kalmár Tibornak a kísérleti munkához nyújtott segítségét.